



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
UNICAMP FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA PAULA SPEZIA DARIF

Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus* var *lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase

CAMPINAS

2018

ANA PAULA SPEZIA DARIF

**Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*,
Kluyveromyces lactis e *Saccharomyces marxianus* var *lactis* em
matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa.Dra. Hélia Harumi Sato

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Paula Spezia Darif e orientada pela Profa. Dra Hélia Harumi Sato.

Campinas, SP
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR CLAUDIA APARECIDA ROMANO –
CRB 8/5816 – BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS –
UNICAMP

D248e Darif, Ana Paula Spezia, 1988-
Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus* var *lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase / Ana Paula Spezia Darif. – Campinas, SP: [s.n.], 2018.

Orientador: Hélia Harumi Sato. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. β -galactosidase. 2. Imobilização. 3. Alginato de cálcio. 4. Transglutaminases. 5. Gelatina. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces marxianus* var *lactis* on matrix of calcium alginate, gelatin and transglutaminase

Palavras-chave em inglês:

β -galactosidase

Immobilization

Calcium alginate

Transglutaminases

Gelatin

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Hélia Harumi Sato [Orientador]

Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Marcus Bruno Soares Forte

Data de defesa: 23-11-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti

Membro Titular (UNIFAL – MG)

Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte

Membro Titular (FEA-DEA-UNICAMP)

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

À Cristian Javier Casamayor, por
todo amor, paciência, ajuda e
motivação ao longo desta caminhada.

À minha avó Aurora, minha mãe
Marisa e minha irmã Gabriela.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pela oportunidade de ter chegado até aqui. Gratidão à luz que me guia e a todos os mestres que me acompanham.

Agradeço ao Cristian por todo incentivo, amor, paciência, e pelos finais de semana em que me acompanhou no laboratório. Agradeço pela imensa ajuda e apoio durante essa caminhada.

À minha mãe que nunca mediu esforços para me proporcionar as melhores oportunidades e a minha irmã por todo amor e carinho.

À Profa. Hélia Harumi Sato pela confiança, generosidade, paciência e conhecimento que me foram oferecidos durante essa jornada.

Ao Leonardo Aguiro, pela confiança que sempre depositou em mim e no meu trabalho. Por ter me liberado do trabalho para cursar as disciplinas do mestrado.

Aos amigos do mestrado Paula, Bruno, Gustavo, Krébs, Alane, Leonardo pelas risadas e bons momentos compartilhados.

À todos os colegas do Laboratório de Bioquímica!

À Liege pela imensa ajuda nos experimentos!

À Joeline pela ajuda e conhecimento transmitidos no início deste trabalho.

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Antônio que transborda amor em nossas vidas.

À todos os professores que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

GRATIDÃO!

RESUMO

A enzima β -galactosidase (EC. 3.2.1.23) catalisa a hidrólise da lactose produzindo glicose e galactose e tem grande aplicação na obtenção de leite e derivados com teor reduzido de lactose.

Neste trabalho foi estudada a imobilização de β -galactosidases comerciais por gelificação iônica em gel de alginato-gelatina-TGase e em esferas e lentes de PVA-Lentikats[®]. Foi estudada também a caracterização das β -galactosidases neutras A, B e C e β -galactosidase ácida D imobilizadas em gel de alginato-gelatina-TGase e nas formas livre e a reutilização da β -galactosidase neutra C e β -galactosidase ácida D imobilizadas.

Entre as três amostras de alginato de sódio testadas para a imobilização da β -galactosidase em alginato de sódio foram obtidos melhores resultados (média de três bateladas) de retenção da atividade de β -galactosidase utilizando alginato tipo III (14000 cP Sigma-A7128 [M/G=1,56]). A adição de gelatina e transglutaminase para a imobilização da β -galactosidase em alginato de cálcio resultou em maior retenção da atividade enzimática, comparada com a imobilização somente com alginato de cálcio. A imobilização da β -galactosidase em esferas e lentes de PVA-Lentikats[®] resultaram em baixa atividade enzimática.

As β -galactosidases A e B neutras, obtidas de *Kluyveromyces lactis*, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase, apresentaram temperatura ótima de atividade a 35°C em pH 7,0 enquanto que a β -galactosidase C, obtida de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou temperatura ótima de atividade a 40°C em pH 7,0. A β -galactosidase ácida D obtida de *Aspergillus oryzae* na forma livre apresentou temperatura ótima de atividade a 50°C em pH 4,5 e a sua forma imobilizada, em pH 4,5, apresentou atividade máxima a 45°C, sendo que acima da temperatura de 50°C mostrou alteração da textura dos grânulos de alginato de cálcio-gelatina-TGase e diminuição da atividade enzimática.

A β -galactosidase neutra C obtida de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 75,6% de

atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 35°C, sendo que a atividade diminuiu para 42% e 12% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente.

A β -galactosidase ácida D imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 77% de atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 45°C e a atividade diminuiu para 62% e 37% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente.

Palavras-chave: β -galactosidase, imobilização, alginato de cálcio, transglutaminases, gelatina.

ABSTRACT

The enzyme β -galactosidase (EC 3.2.1.23) catalyzes the hydrolysis of lactose producing glucose and galactose and has great application in the production of milk and derivatives with reduced lactose content.

In this study the immobilization of commercial β -galactosidases by ionic gelation on alginate-gelatine-TGase gel and on PVA-Lentikats[®] beads and lenses was evaluated. The characterization of neutral β -galactosidases A, B and C and acidic β -galactosidase D immobilized on alginate gelatine-TGase gel and in the free forms and the reuse of the immobilized neutral β -galactosidase C and β -galactosidase acidic D was also studied.

Among the three sodium alginate samples tested for immobilization of β -galactosidase in sodium alginate, better retention (three-batch average) of β -galactosidase activity was obtained using type III alginate (14000 cP Sigma-A7128 [M / G = 1.56]). The addition of gelatin and transglutaminase to the immobilization of β -galactosidase in calcium alginate resulted in a greater retention of the enzymatic activity, compared to immobilization with calcium alginate alone. Immobilization of β -galactosidase on PVA-Lentikats[®] beads and lenses resulted in low enzymatic activity.

Neutral β -galactosidases A and B, obtained from *Kluyveromyces lactis*, in the free forms and immobilized in calcium alginate-gelatin-TGase, presented an optimum activity at 35°C in pH 7,0, whereas β -galactosidase C, obtained from *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, in the free form and immobilized in calcium alginate-gelatin-TGase showed an optimum temperature of activity at 40°C at pH 7,0. The acidic β -galactosidase D obtained from *Aspergillus oryzae* in the free form had an optimum activity at 50°C at pH 4,5 and its immobilized form, at pH 4.5, showed maximum activity at 45°C and above 50°C presented texture alteration of the calcium alginate-gelatin-TGase granules and decreased enzymatic activity.

Neutral β -galactosidase C obtained from *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, immobilized in calcium alginate-gelatin-TGase showed about 75.6% enzymatic activity after 3 batches of 6 hours at 35°C, and the activity decreased to 42% and 12% in the 5th and 10th batch, respectively.

Acid β -galactosidase D immobilized on calcium alginate-gelatin-TGase showed about 77% enzymatic activity after 3 batches of 6 hours at 45°C and activity decreased to 62% and 37% in the 5th and 10th batch, respectively.

Key words: β -galactosidase, immobilization, calcium alginate, transglutaminases, gelatin.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades das β -galactosidases produzidas por diferentes microrganismos.	25
--	----

Tabela 2. Valores codificados dos níveis utilizados das variáveis no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} para otimização da composição da matriz de imobilização das β -galactosidases comerciais.	51
--	----

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , enzima TGase, gelatina e β -galactosidase C, na imobilização.	52
--	----

Tabela 4. Porcentagem de atividade da β -galactosidase durante 5 bateladas de 1h e média dos valores obtidos nos 19 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , TGase, gelatina e β -galactosidase neutra C (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>).	69
--	----

Tabela 5. Porcentagem da eficiência de imobilização da β -galactosidase neutra C (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>) obtidos nos 19 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , TGase, gelatina e β -galactosidase.	70
---	----

Tabela 6. Resultados dos efeitos e p-valor do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} na atividade de β -galactosidase estudada em 5 bateladas de 1 hora individualmente	71
--	----

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1. Rotas de conversão da lactose pela enzima β – galactosidase (MARTINS & BURKET, 2009).	23
Figura 2. Métodos de imobilização enzimática – (A) Adsorção; (B) Ligação Covalente; (C) Aprisionamento; (D) Encapsulamento; (E) Ligação Cruzada (adaptado de GUIBAN, 2006).	34
Figura 3. Estrutura química do alginato. (a) Conformação do β -D-ácido manurônico (M) e conformação do α -L – ácido gulurônico (G); (b) Composição dos blocos de alginato G – blocos, M – blocos e MG – blocos (REHM, 2009).....	39
Figura 4. Ilustração da complexação de cadeias de alginato e íons cálcio e formação de gel (REHM, 2009).....	40
Figura 5. Atividade residual (%) da β -galactosidase neutra C (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio, durante 3 bateladas de 60 min a 35°C.....	61
Figura 6. Atividade residual (%) da β -galactosidase neutra C (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio com gelatina e TGase, durante 3 bateladas de 60 min a 35°C.	62
Figura 7. Atividade residual (%) da β -galactosidase ácida D (<i>A. oryzae</i>) imobilizada em diferentes tipos de alginato, durante 3 bateladas de 60 min a 45°C.	63
Figura 8. Atividade residual (%) da β -galactosidase ácida D (<i>A. oryzae</i>) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio com gelatina e TGase, durante 3 bateladas de 60 min a 45°C.....	64
Figura 9. Atividade residual (%) das β -galactosidases neutra C (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>) e ácida D (<i>A. oryzae</i>) imobilizadas em diferentes suportes.	66

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus* var *lactis*) neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.73

Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase D ácida (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.....74

Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase: a) Enzima A (β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*); b) Enzima B (β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*); c) Enzima C (β -galactosidase de *Saccharomyces marxianus* var *lactis*).77

Figura 13. Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina e TGase.79

Figura 14. Efeito do pH na atividade das β -galactosidases A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus* var *lactis*) neutras nas formas livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.80

Figura 15. Efeito do pH na atividade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.....82

Figura 16. Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase: a) Enzima A (β -galactosidase de *K. lactis*); b) Enzima B (β -galactosidase de *K. lactis*); c) Enzima C (β -galactosidase de *S. marxianus* var *lactis*).83

Figura 17. Efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*), na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.....84

Figura 18. Estudo da reutilização da β -galactosidase neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis* e da β -galactosidase ácida D obtida de *Aspergillus oryzae* imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Enzimas	21
2.2	β -galactosidase	23
2.2.1	Aplicação da β -galactosidase na indústria de alimentos.....	27
2.3	Lactose.....	28
2.4	Intolerância à lactose	30
2.5	Imobilização de enzimas	32
2.5.1	Métodos de Imobilização	34
2.5.1.1	Imobilização por adsorção.....	35
2.5.1.2	Imobilização por ligação covalente.....	36
2.5.1.3	Imobilização por encapsulação	37
3	Material e métodos	44
3.1	Material	44
3.2	Estudo da imobilização da β - galactosidase	44
3.2.1	Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -galactosidase em alginato de cálcio	44
3.2.1.1	Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes tipos de alginato	45
3.2.1.1.1	Estudo da reutilização da enzima β -galactosidase imobilizada em diferentes tipos de alginato	45
3.2.1.2	Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase neutra e ácida em diferentes tipos de alginato com adição de gelatina e TGase	46
3.2.2	Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) - Lentikats®	46
3.2.2.1	Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) – lentes de Lentikats®	47

3.2.2.2 Imobilização de β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) – Lentikats [®] - esferas	47
3.2.2.2.1 Estudo da reutilização da enzima β -galactosidase imobilizada em Lentikats [®] - esferas e lentes.....	48
3.3 Determinação da atividade de β -galactosidase.....	48
3.3.1 Determinação da atividade enzimática da β -galactosidase neutra e ácida, na forma livre	48
3.3.1.1 Determinação de glicose por método enzimático	49
3.3.2 Determinação da atividade enzimática das β -galactosidases neutras e ácida na forma imobilizada	50
3.4 Estudo das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 , gelatina, TGase na imobilização da β -galactosidase em alginato de cálcio-gelatina-TGase utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	50
3.4.1 Imobilização das enzimas β -galactosidases em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TGase após o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	52
3.4.2 Eficiência de imobilização	53
3.5 Caracterização das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	53
3.5.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	54
3.5.1.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras , nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	54
3.5.1.2 Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	54
3.5.2 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	55
3.5.2.1 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	55
3.5.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	55
3.5.3 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras e ácidas, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	56

3.5.3.1	Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	56
3.5.3.2	Estudo do pH na atividade da enzima β -galactosidase ácida, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	56
3.5.4	Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase	57
3.5.4.1	Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase	57
3.5.4.2	Efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	58
3.5.5	Estudo da reutilização das β -galactosidases neutra (<i>S. marxianus</i> var <i>lactis</i>) e ácida (<i>A. oryzae</i>) imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase em sistema de batelada	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1	Seleção dos suportes para imobilização das enzimas β -galactosidase neutra e ácida	60
4.1.1	Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes tipos de alginato	60
4.1.2	Estudo da imobilização das β -galactosidases neutra C e ácida D em álcool polivinílico (PVA) – lentes e esferas de Lentikats® e em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TGase	66
4.2	Estudo das variáveis na imobilização da β -galactosidase neutra C em alginato de cálcio- gelatina-TGase utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{51}	68
4.3	Caracterização das β -galactosidases neutras (A, B, C) e ácida (D) nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	72
4.3.1	Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras e ácidas, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	72
4.3.1.1	Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	72

4.3.1.2 Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase ácida D (<i>A. oryzae</i>), nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	74
4.3.2 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácidas nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	75
4.3.2.1 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	75
4.3.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	78
4.3.3 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras e ácidas nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	79
4.3.3.1 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	79
4.3.3.2 Efeito do pH na atividade da enzima β -galactosidase ácida, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	81
4.3.3.3 Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase	82
4.3.3.4 Estudo do efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase	84
4.4 Estudo da reutilização das β -galactosidases neutra C e ácida D imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase em sistema de batelada	85
5 CONCLUSÕES	87
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8 ANEXO – CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO	110

1 INTRODUÇÃO

O leite apresenta-se como exclusivo alimento de mamíferos jovens, pois contém diversas substâncias fundamentais para a nutrição. É rico em nutrientes que participam do desenvolvimento e manutenção do organismo, possuindo em sua composição cálcio, gorduras, proteínas, carboidratos e vitaminas. No leite encontram-se também aproximadamente 5% de lactose. Esse dissacarídeo é composto por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose unidas por uma ligação beta 1-4 e é responsável pelo sabor adocicado do leite (WALSTRA et al., 2006).

A intolerância à lactose é o tipo mais comum de intolerância a carboidratos e acomete cerca de 75% da população adulta mundial, representando a primeira vista, um obstáculo ao consumo de alimentos derivados do leite. Dessa forma, a ingestão diária recomendada de alguns nutrientes pode não ser atingida, aumentando o risco de doenças, especialmente no que se refere à osteoporose. O consumo habitual desses alimentos é recomendado, principalmente, para que se atinja a adequação diária de ingestão de cálcio, nutriente este que, dentre outras funções, é fundamental para a formação e a manutenção da estrutura óssea do organismo (JACKSON & SAVAIANO, 2001; MUNIZ et al., 2013). Dado esse contexto, diversos estudos tem sido conduzidos e alternativas tem sido propostas com o objetivo de garantir aos indivíduos intolerantes à lactose ingestões adequadas dos nutrientes abundantes nos alimentos lácteos (TÉO, 2002). A enzima β -galactosidase desperta grande interesse à saúde humana, pois quando ausente no organismo humano a lactose consumida não é digerida causando desconfortos gastrointestinais (MORTOZA, 2012).

O queijo é um dos principais produtos derivados do leite e na sua fabricação em torno de 85 a 95% do volume do leite utilizado resultam em soro de queijo, que contém aproximadamente 55% dos nutrientes do leite. Entre eles estão a lactose (4,5- 5%), as proteínas solúveis (0,6-0,8%), os lipídeos (0,4-0,5%) e traços de sais minerais (ORDÓÑEZ, 2005; CARVALHO et al., 2013; LIMA & ROCHA, 2016). A

produção mundial de soro de leite foi estimada em $180-190 \times 10^6$ toneladas/ano (BALDASSO, et al, 2011).

Em função de seu alto teor de lactose, a utilização de soro de leite tem sido limitada, sendo este normalmente descartado como um efluente de difícil degradação (CARMINATTI, 2001; FALLEIROS, 2012). O descarte de soro de leite representa um problema econômico e ambiental. A bioconversão da lactose do leite poderia reduzir a poluição da água e gerar produtos de interesse para ração animal, nutrição humana e produtos para confeitaria, indústria farmacêutica e agrícola (SPALATELU, 2012).

Devido ao grande potencial de aplicação na indústria de alimentos, a imobilização de β -galactosidase ou lactase, como também é conhecida, tem ganhado destaque nos últimos anos. Esta enzima possui a capacidade de hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos, glicose e galactose (KLEIN, 2010). A β -galactosidase pode ser aplicada na obtenção de leite e outros derivados com baixo teor de lactose, prevenção da cristalização da lactose em sorvete, doce de leite e derivados, síntese de oligossacarídeos e aumento da biodegradabilidade do soro de leite (NIVETHA & MOHANASRINIVASAN, 2017; MLICHOVÁ e ROSENBERG, 2006; GAUER et al., 2006).

O uso de biocatalisadores em aplicações industriais resulta em alto custo requerendo a recuperação e a reutilização destes para tornar o processo economicamente viável. Isso pode ser alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada. A imobilização pode aprimorar as propriedades funcionais das enzimas em condições severas, tais como estabilidade, especificidade e atividade. A enzima imobilizada também pode permanecer ativa por longos intervalos de tempo e ser reutilizada várias vezes em reatores industriais (HAIDER E HUSAIN, 2009; HANEFELD et al., 2009; NISHA et al., 2012; JAFARY et al., 2016).

A fim de viabilizar a sua aplicação industrial, a tecnologia de imobilização enzimática deve considerar os seguintes parâmetros: custo de imobilização, retenção da atividade enzimática, estabilidade térmica da enzima, estabilidade da atividade enzimática em diferentes valores de pH, número de ciclos da enzima,

características de resistência e custo do suporte (BON, 2008; ESCOBAR et al., 2014).

Neste contexto este trabalho visou a imobilização de β -galactosidase comercial neutra e ácida para hidrólise de lactose, respectivamente, em leite e soro de leite, estudo das características bioquímicas da enzima livre e imobilizada e reutilização da β -galactosidase neutra e ácida para hidrólise da lactose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas podem ser definidas como proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores químicos (LEHNINGER, 2008).

As enzimas se tornam atrativas por possuírem várias propriedades interessantes como atividade de hidrólise e síntese, dependendo da concentração de substrato e da atividade de água, e por terem alta flexibilidade de aplicação em biotransformação, destacando seu uso em indústrias químico-farmacêuticas (ROVEDA et al., 2010). Podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana.

Quando comparadas com catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos (PEREIRA, 2004), as enzimas, graças a sua estrutura complexa, podem apresentar um alto grau de especificidade, propriedade ausente nos catalisadores inorgânicos (BORZANI et. al., 2001). Essa característica é importante quando se trata de processos industriais, pois produtos secundários indesejáveis que normalmente aparecem no final das reações são reduzidos ou eliminados. O uso de enzimas pode diminuir as reações secundárias indesejáveis e posteriores problemas de separação dos subprodutos. As enzimas também possuem alta seletividade, maior atividade catalítica e são facilmente encontradas na natureza (CAMMAROTA, 2006).

No decorrer dos anos, as enzimas estão destacando-se devido a sua crescente utilização em diferentes ramos das indústrias alimentícias, farmacêuticas, químicas, têxteis, etc. O mercado mundial de enzimas industriais representa 60% do mercado de enzimas. Além disso, as enzimas operam em condições amenas de temperatura, pH e pressão enquanto os catalisadores químicos requerem condições críticas de operação (MONTEIRO & SILVA, 2009).

O mercado consumidor de enzimas está em expansão. De acordo com a reportagem da *Business Communications Company*, o valor de venda das enzimas para utilização industrial foi estimado em 5 bilhões de dólares em 2008. As projeções naquela época previam um aumento na taxa de crescimento do mercado de biocatalisadores de aproximadamente 4% a 5% ao ano (HASAN & HAMEED, 2006). O mercado global de enzimas industriais foi de quase US \$ 6,1 bilhões em 2017 e foi estimado um alcance de US \$ 8,5 bilhões em 2022 (FERRER et al., 2016).

Os biocatalisadores apresentam algumas desvantagens para aplicação em processos industriais, como alto custo para isolamento e purificação, instabilidade estrutural por serem removidas de seus ambientes naturais, sua alta sensibilidade a condições que diferem das suas condições ótimas e substâncias que podem atuar como inibidores e alta sensibilidade a variações de pH, devido à sua formação por grupos químicos que podem sofrer ionização e adquirir cargas momentâneas e a sensibilidade a altas temperaturas, causando rompimento de ligações e interações fracas. Desta forma uma das alternativas encontradas para tornar a utilização de enzimas em processos menos onerosos, é a sua imobilização (KRAJEWSKA, 2004; MONTEIRO e SILVA, 2009; KLEIN, 2010).

Em relação a forma livre, as enzimas imobilizadas apresentam vantagens, sendo que a proteína pode ser reutilizada em outros ciclos do processo (ÖZDURAL et al., 2003; CAO, 2005; POLIZZI et al., 2007). Outras vantagens inerentes à técnica é a possibilidade de facilitar o controle das reações, evitar a contaminação do produto por proteína e permitir sua utilização em diferentes configurações de reatores. A técnica de imobilização de enzimas também pode reduzir a inibição frente aos produtos formados e meios reacionais (KLIBANOV, 1979; MATEO et al., 2007; SHELDON, 2007; RODRIGUES et al., 2013; SCHOFFER, 2013).

Processos de imobilização podem inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém, não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (FRAMPTON; ZELISKO, 2014). Como exemplo de fator que acarreta uma perda de atividade aparente tem-se as restrições difusionais, ou seja, limitações do substrato ao sítio ativo devido à

presença da matriz sólida (a enzima fica com sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte) (DE CASTRO et al., 2008; DANTAS, 2017).

2.2 β -galactosidase

A β -galactosidase hidrolisa a ligação β -1,4 e é classificada como uma hidrolase com capacidade de catalisar a hidrólise do grupamento terminal β -D-galactosil de substratos, tais como a lactose, em glicose e galactose. Em alta concentração de lactose a β -galactosidase catalisa reações de transgalactosilação com outras moléculas aceptoras sintetizando galactooligossacarídeos (Figura 1) (DRAGOSITS et al., 2014).

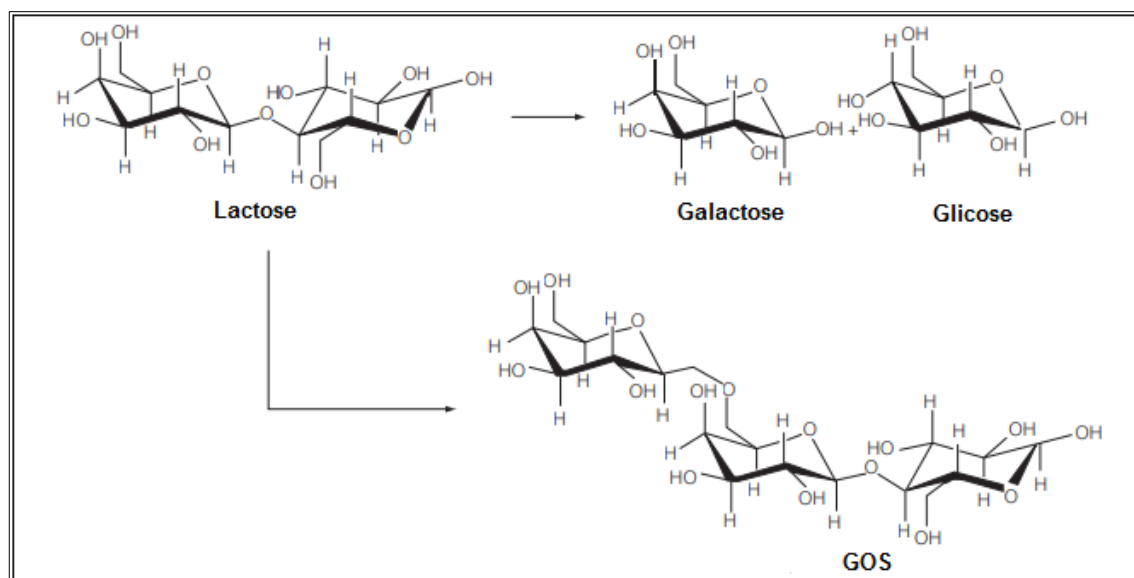


Figura 1. Rotas de conversão da lactose pela enzima β – galactosidase (MARTINS & BURKET, 2009).

Uma das principais aplicações de enzimas na indústria alimentícia é na hidrólise de lactose do leite e seus derivados, utilizando a enzima β -galactosidase [lactase, β -D-galactosideo galactohidrolase; EC 3.2.1.23], obtendo, assim, alimentos com baixos teores de lactose, cujo resultado é a melhora da solubilidade e da

digestibilidade de leites e derivados lácteos, tornando-se ideais para consumidores intolerantes a este açúcar (CAMPELLO, 2010; HUSAIN, 2010; KLEIN, 2010).

As β – galactosidases são encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, animais e micro-organismos. Nas plantas são encontradas em amêndoas, pêssegos, damascos, maçãs, alguns tipos de rosas selvagens, sementes de soja, alfafa e café. A função das β -galactosidases nas plantas parece estar relacionada com a capacidade da enzima em degradar açúcares da parede vegetal favorecendo o amadurecimento das frutas e germinação das sementes, sendo sua atividade aumentada nesta fase (KISHORE & KAYASTHA, 2012; NIE et al., 2013).

A enzima também é encontrada em órgãos de animais como intestino, cérebro, placenta e testículos de cães, coelhos, bezerros, ovelhas, cabras e ratos. A β – galactosidase é produzida por fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo essas as fontes preferidas para aplicação industrial, pois podem ser facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também mais facilmente expressas em organismos de cultivo já estabelecido e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento (GANDHI, 1997; SOARES et al., 2001, SANTIAGO et al., 2004; COLEN, 2006; SEN et al., 2012).

As propriedades das β -galactosidases variam muito de acordo com sua fonte (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades das β -galactosidases produzidas por diferentes microrganismos.

FONTE	pH ótimo de atividade	pH de estabilidade	Temperatura ótima atividade (°C)	Temperatura de estabilidade (°C)	Cofatores necessários	Referências bibliográficas
<i>Aspergillus niger</i>	-	2,5-8,0	55-60	-	-	Widmer e Leuba, 1979
	4,5-5,5	-	50-55	-	-	Gékas e Lopes, 1985
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	4,5 – 7,5	50	45	-	Kobayashi e Kasuga, 1976
<i>Escherichia coli</i>	-	6,0-8,0	40	-	Na ⁺ , K ⁺	Wallenfels et al, 1960
	7	-	40	-	-	Gékas e Lopes, 1985
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	-	6,5-7,5	37	-	K ⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺	Mahoney e Wtaker, 1977
	6,6	-	37	-	-	Gékas e Lopes, 1985
<i>Kluyveromyces lactis</i>	-	7,0-7,5	35	-	Mg ²⁺	Cavaille e Combes, 1995
	6,9-7,3	-	35	-	-	Gékas e Lopes, 1985
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6,6	-	37	-	-	Alves, 2008
<i>Saccharomyces lactis</i>	7	6,6 – 7,7	35	Instável acima de 40	-	Gould, B, J, 1972
<i>Penicillium canescens</i>	-	4,0-5,0	30	-	-	Budriene et al., 2005
<i>Thermus s.p strain T2</i>	-	6,0 - 10,0	70	-	-	Ladero et al., 2000

O uso de enzimas em alimentos no Brasil é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA e as enzimas permitidas devem estar contempladas na lista positiva descrita na Resolução RDC nº 53 de 07 de outubro de 2014. A enzima β -galactosidase utilizada na indústria alimentícia deve ser obrigatoriamente de origem microbiana proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* expresso em *Aspergillus niger*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* ou *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2014). Essas espécies são reconhecidas pela Food and Drug Administration (FDA) e são classificadas como *Generally Recognized As Safe* (GRAS), sendo consideradas seguras para aplicação em alimentos.

A enzima obtida da *Escherichia coli*, por exemplo, é a β -galactosidase mais conhecida em níveis estruturais e catalíticos, porém, não é recomendada para uso na indústria de alimentos devido a potencial patogenicidade do micro-organismo e por estar diretamente associada a coliformes fecais. Enzimas extraídas de *A. niger*, *A. oryzae*, *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*), são consideradas seguras, devido ao histórico de suas aplicações e os numerosos estudos realizados (GEKAS, LÓPEZ – LEIVA, 1985).

As β -galactosidases expressas por fungos filamentosos geralmente são mais ativas em pH ácido do que as produzidas a partir de bactérias e leveduras. A escolha da enzima vai depender da condição da reação a ser catalisada. Para a hidrólise do leite normalmente são utilizadas enzimas produzidas por leveduras, cujo pH ótimo de atividade (pH 6,0-7,0) é próximo a neutralidade. Por outro lado, para a hidrólise de soro de leite, enzimas de origem fúngicas (pH 3,0-5,0) são mais utilizadas. Além disso, as β -galactosidases de fungos filamentosos, ao contrário das produzidas por leveduras, parecem ser ativas sem a presença de íons como co-fatores (NATH et al., 2014).

Um dos problemas apresentados pela β -galactosidase é sua inibição por um dos produtos formados na reação, a galactose, e a formação de isômeros. Galactose e glicose são inibidores competitivos e não competitivos, respectivamente, sendo a inibição por glicose ($K_i = 794$ mM) muito menor que a inibição por galactose ($K_i = 42$ mM). Sendo assim a hidrólise da lactose não ocorre por completo (KLEIN, 2010).

As fontes utilizadas de β -galactosidase hoje ainda não apresentam características cinéticas desejadas e existe uma grande procura por enzimas com propriedades superiores, tais como melhor estabilidade térmica em pH neutro e boa atividade a baixas e altas temperaturas. β -galactosidases termoestáveis, obtidas de micro-organismos termófilos tem grande potencial de aplicação (FISCHER, 2010).

A vantagem da hidrólise enzimática em comparação a hidrólise química, da lactose, reside no fato de que a reação se processa a temperatura relativamente baixa, numa faixa que pode variar de 4°C a 40°C, permitindo uma maior economia energética com preservação das propriedades das moléculas (VITOLLO, 2001). Já a

hidrólise química, necessita de condições mais drásticas de temperatura que podem variar de 90°C a 150°C e alta acidez, com pH próximo de 1,5, sendo realizada pela adição de ácidos fortes, como o ácido clorídrico ou sulfúrico, em altas concentrações. A hidrólise química da lactose pode resultar em problemas tecnológicos, como a desnaturação proteica e alterações na cor e odor dos produtos, sendo que não é utilizada para alimentos (LADERO et. al., 2000).

A β – galactosidase pode ser utilizada na forma livre ou imobilizada. Normalmente em processos de batelada é utilizada a forma livre e em processos contínuos, a forma imobilizada (BODALO et. al., 2001). A enzima na forma imobilizada tem grande potencial para aplicação industrial já que poderá apresentar a possibilidade de ser utilizada diversas vezes e o processo poderia ser conduzido de forma contínua (SZCZODRAK, 2000).

2.2.1 Aplicação da β -galactosidase na indústria de alimentos

A principal aplicação biotecnológica da β -galactosidase encontra-se na produção de leite com baixo teor de lactose e derivados de produtos lácteos para o consumo por pessoas intolerantes à lactose e também pode ser empregada para hidrolisar a lactose presente no soro de leite para viabilizar os processos de produção de biomoléculas e biomassa empregando esses soros como meios de cultivos, uma vez que seus descartes inadequados constituem um grave problema ambiental. Além disso, galactooligossacarídeos também podem ser formados (GAUER et. al, 2006; HAIDER E HUSAIN, 2009; KOUTINAS et al., 2009).

A β -galactosidase usada em escala industrial devem ser provenientes de micro-organismos geralmente reconhecidos como seguros (*Generally Recognized as Safe* - GRAS). As características importantes para uso da enzima em processos industriais são a termoestabilidade e a elevada atividade enzimática a baixa temperatura, possibilitando sua aplicação em condições que não alteram as

características sensoriais e nutricionais do leite e seus derivados (HUSAIN, 2010; MLICHOVÁ & ROSENBERG, 2006).

A hidrólise da lactose em escala industrial pode ser obtida pelo emprego da β -galactosidase na sua forma livre líquida ou em pó (liofilizada) e o processo de obtenção de leite com baixo teor de lactose, pode seguir por dois caminhos: no primeiro, o leite cru é submetido ao processo de esterilização (UHT – 141°C/5 segundos) e, depois do resfriamento, adiciona-se a β -galactosidase, e o leite é transferido para embalagem asséptica. A hidrólise da lactose ocorre no interior da embalagem. No segundo, o leite cru passa por uma pasteurização (72°C/15 segundos), e, após o resfriamento, a β -galactosidase é adicionada. A hidrólise é realizada dentro de tanques de armazenamento; assim que termina esse processo, realizam-se a esterilização e o envase asséptico e a enzima é inativada (LONGO, 2006).

A dosagem recomendada, segundo fornecedor de β -galactosidase é de 0,8 a 1,2 mL de enzima por 1000 mL de leite à 5°C por 24 horas ou, na mesma dosagem à 40°C por 6 horas de reação para hidrólise da lactose presente no leite (SternEnzym GmbH & Co. KG). Em 2015, o preço médio de venda da β -galactosidase para aplicação industrial era em média R\$ 250,00/litro.

A aplicação de β -galactosidase na hidrólise de lactose na indústria de laticínios tem atraído a atenção de pesquisadores e embora a maioria das indústrias ainda utilize a β -galactosidase na forma livre, a imobilização da enzima é uma área de grande interesse devido aos seus potenciais benefícios e possíveis reduções de custo (PANESAR et al., 2010).

2.3 Lactose

A lactose é um dissacarídeo composto por glicose e galactose unidos por ligações $\beta - 1,4$, que está presente no leite de quase todos os mamíferos e sua concentração varia de 2 a 10%. O leite bovino apresenta um teor de lactose entre

4,4% a 5,2% e o leite humano contém cerca de 7% de lactose (GÄNZLE et. al, 2008).

A solubilidade da lactose é baixa quando comparada a outros dissacarídeos, sendo aproximadamente 10% da sacarose, e a doçura da lactose em solução é cerca de 20% da sacarose em temperatura ambiente (GUIDINI, 2009). A lactose, quando em solução, está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, que influencia a sua solubilidade e ocasiona a formação de cristais que irão prejudicar a qualidade do produto final. Essa mudança na rotação e a transformação de uma forma para a outra ocorre até o equilíbrio mutarrotacional, que acontece quando 62,25 % da lactose encontra-se na forma β e 37,7 % na forma α , na temperatura de 25°C (FISCHER, 2010).

O processo de cristalização da lactose contribui para o aparecimento de estruturas arenosas nos produtos e os mesmos são percebidos sensorialmente quando apresentam um tamanho superior a 10 μm . Os fatores que influenciam essa cristalização da lactose são a velocidade de mutarrotação das formas β e α , viscosidade, pH, grau de saturação da solução e a temperatura dos produtos (FISCHER, 2010).

A lactose tem a tendência de adsorver odores e sabores e é higroscópica, o que ocasiona a formação de cristais em derivados lácteos que se encontram na forma de pós. Além do mais, a ingestão da lactose pode causar distúrbios intestinais para uma parcela da população que sofre de intolerância a este açúcar, ocasionada pela deficiência na produção da lactase no intestino. Outro problema é a lactose presente no soro de queijo que devido a alta DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) torna-se um problema para a indústria de laticínios no tratamento de seus efluentes (SENER et.al., 2006).

Uma das alternativas para ampliar a utilização desse carboidrato e evitar os problemas tecnológicos provenientes da sua cristalização, é hidrolisá-lo enzimaticamente em seus dois monômeros, glicose e galactose, com a finalidade de produzir açúcares mais doces, mais facilmente fermentescíveis e mais solúveis, diminuindo os efeitos causados pela cristalização da lactose e aumentando o período de estocagem dos produtos. E no ponto de vista nutricional, a hidrólise da

lactose, possibilita a obtenção de leite com baixo teor de lactose, tornando-o mais digerível para pessoas com problemas relacionados à intolerância à este dissacarídeo (MAHONEY, 1997). A hidrólise da lactose também é recomendada na produção de leite condensado, sorvete e soro de leite em pó (HUSAIN, 2010).

2.4 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose é uma deficiência do organismo para digerir completamente a lactose e é consequência de baixos teores ou ausência da β -galactosidase na mucosa intestinal. Como resultado, a falta da enzima faz com que a lactose seja fermentada no intestino e os sintomas da intolerância variam de desconforto abdominal, flatulência e diarreia dependendo da dose de lactose, do tempo de trânsito e adaptação das bactérias do colón. A β -galactosidase é encontrada nas extremidades das vilosidades da mucosa do intestino delgado e uma vez que as moléculas de lactose não conseguem ser absorvidas intactas, a enzima auxilia no metabolismo desse dissacarídeo (TROELSEN, 2005; ADHIKARI et. al., 2010; KLEIN 2010; PAIGE, 2013).

Todos os mamíferos, após o desmame, tem perda de atividade enzimática da β -galactosidase e esta perda pode estar ligada a fatores genéticos polimórficos. Em humanos, a partir dos 2 anos de idade ocorre uma progressiva redução da sua atividade que continua na infância e adolescência, chegando a atingir 5 a 10% dos níveis encontrados no nascimento. Esta situação é denominada estado de hipolactasia ou não persistência da β -galactosidase, que vai gerar a Hipolactasia Primária do Tipo Adulto (HPTA) (WORTAMANN et al., 2013).

A HPTA é a principal causa de intolerância à lactose sendo está determinada geneticamente e acomete em torno de 70% da população mundial (SWALLOW, 2003; SAVAIANO et al., 2013; FOX et al., 2015; CORGNEAU et al., 2017, SAQIB et al., 2017).

Segundo WORTMANN et al., (2013) a hipolactasia refere-se à diminuição da atividade da β -galactosidase, numa condição primária ou secundária. Como

primária, encontram-se a HPTA e a congênita. Na HPTA a enzima está normal, mas diminui a expressão ao longo da vida, já na congênita, esta enzima está ausente ou é incompleta (ROBAYO-TORRES e NICHOLS, 2007).

Os países com maior porcentagem de indivíduos intolerantes a lactose são Ásia e África sendo que 90% da população tem dificuldade de metabolizar esse dissacarídeo enquanto que na Europa essa deficiência acomete apenas 5% da população (BULHÕES et al., 2007).

O leite e seus derivados contribuem com cerca de 73% do cálcio necessário na dieta. Para que indivíduos intolerantes se beneficiem dos nutrientes do leite, existem no mercado produtos lácteos livres de lactose ou com baixo teor de lactose, obtidos a partir da hidrólise enzimática utilizando a β -galactosidase. Porém, o custo dos produtos deslactosados ainda é mais elevado quando comparado com produtos não deslactosados. Este fato está relacionado com o custo do processo (HERTZLER et al., 2013; MARTARELLO, 2016).

A RDC 136/2017 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determinou mudanças nas informações de rótulos de alimentos que contêm lactose. Os itens com mais de 100 miligramas (mg) de lactose para cada 100 gramas ou mililitros do produto devem indicar esta informação no rótulo. Com a instituição dessas regras, o mercado brasileiro de alimentos terá três tipos de rotulagem para a lactose: “zero lactose” ou “baixo teor”, para os produtos cujo teor de lactose tenha sido reduzido, e “contém lactose”, nos demais alimentos com presença desse açúcar. A indústria tem prazo até fevereiro de 2019 para adequar os rótulos dos produtos (ANVISA 2017).

É necessário o desenvolvimento de métodos e tecnologias para disponibilizar leite com baixo teor de lactose no mercado a baixo custo. O leite com baixo teor de lactose pode ser preparado por meio de sua remoção física ou de sua hidrólise enzimática, pela liberação dos seus correspondentes monossacarídeos, glicose e galactose (CUNHA et al., 2007; FAEDO et al., 2013). A utilização da enzima β -galactosidase é um dos métodos mais interessantes e brandos para se obter um produto com baixo teor de lactose.

2.5 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é uma técnica que vem sendo cada vez mais utilizada a fim de melhorar a aplicação industrial de enzimas permitindo redução de custos. Sabe-se, porém, que não existem técnicas universais aplicáveis a todas as enzimas ou técnicas totalmente eficientes de imobilização de enzimas, mas sim uma gama de possibilidades e parâmetros que devem ser otimizados (KLEIN, 2010). Para cada enzima métodos devem ser testados para se escolher procedimento simples, econômico e que resulte em enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDES et al., 2011).

A imobilização de uma enzima consiste na ligação da enzima em um suporte sólido ou por oclusão em vesículas ou confinamento em membranas (SECUNDO et al., 2008; VAIDYA, 2008; DIZGE et al., 2009; MACARIO et al., 2009; MILETIC et al., 2009).

As enzimas podem ser imobilizadas tanto quimicamente (ligações covalentes entre suporte - enzima) como fisicamente (ligações fracas entre suporte – enzima) (KENNEDY, 1983; SCOUTEN et al, 1995; KRAJEWSKA, 2004).

Quando imobilizado, o biocatalisador pode ser reutilizado diversas vezes ao contrário da forma livre. Além de tornar o processo economicamente mais viável, a imobilização de enzimas pode melhorar a estabilidade operacional e térmica, facilitar a sua separação do produto no final do processo, sendo que a contaminação do produto pela enzima é quase nula (GROSOVÁ et al., 2008).

Como em todo processo, mudanças estruturais da enzima durante a imobilização, alterações de pH e temperatura e agitação podem diminuir a atividade das enzimas. Quando comparada com a enzima em sua forma livre, a enzima imobilizada pode ter sua atividade catalítica reduzida devido aos efeitos difusionais e sua constante de Michaelis (K_m) aumentada. Essas alterações são resultado da modificação estrutural do ambiente da enzima devido à interação suporte - enzima, onde o material do suporte tem forte influência no desempenho enzimático (KRAJEWSKA, 2004). A imobilização do biocatalisador poderá também ocasionar alterações na faixa de temperatura e pH ótimo de atividade e aumentar a

estabilidade das enzimas diminuindo os custos operacionais durante reuso (NERI et al., 2009).

O aumento da estabilidade da enzima devido à imobilização depende da técnica escolhida. Frequentemente a imobilização leva a um aumento da resistência das enzimas contra fatores desnaturantes como pH extremo, altas temperaturas, força iônica elevada, agentes químicos (CAMMAROTA & FREIRE, 2006). Em alguns casos as enzimas são mais estáveis se imobilizadas dentro de seu ambiente natural, a célula (GENARI et al., 2003; KRAJEWSKA, 2004).

Os requisitos que a matriz para imobilização deve apresentar depende do tipo de enzima a ser imobilizada e a aplicação pretendida, sendo desejável que o material não seja facilmente degradável e seja compatível com a enzima. O processo de imobilização não deve ocasionar danos estruturais e desnaturação da enzima e o suporte deve garantir o aprisionamento da enzima durante todo o processo de hidrólise (KHAN et al., 2005; KULSHRESTHA & HUSAIN, 2006).

A morfologia da matriz desempenha um importante papel em bioprocessos contínuos utilizando biocatalisadores imobilizados (TAQIEDDIN & AMIJI, 2004; MILOSAVIC et al., 2005). Algumas matrizes poliméricas têm sido utilizadas para a imobilização da β -galactosidase para usos industriais. Estas matrizes podem oferecer alta resistência mecânica e alta densidade, estabilidade térmica, facilidade de manuseio, taxas de fluxo elevadas em reatores contínuos e fácil regeneração. Matrizes poliméricas para imobilização enzimática podem ser divididas em dois grupos: polímeros naturais e artificiais. Os polímeros naturais incluem alginato, hidrogéis, quitosana, etc. Diversos polímeros artificiais tem sido utilizados para imobilização de enzimas entre eles poliacrilato, poliestireno, etc (CAPRIO et al., 2000). A Figura 2 apresenta alguns métodos de imobilização de enzimas.

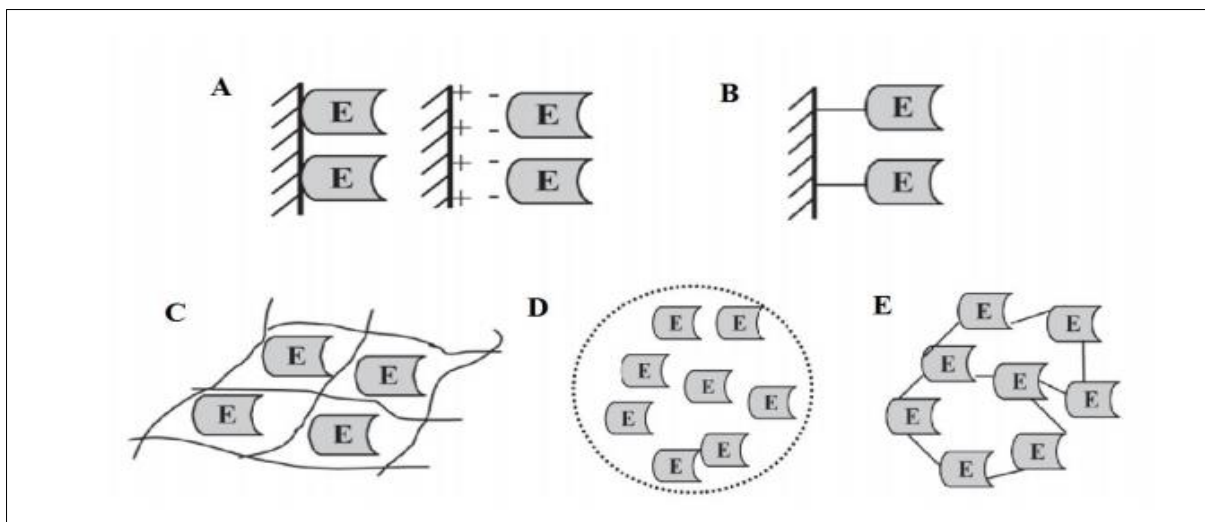


Figura 2. Métodos de imobilização enzimática – (A) Adsorção; (B) Ligação Covalente; (C) Aprisionamento; (D) Encapsulamento; (E) Ligação Cruzada (adaptado de GUIBAN, 2006).

2.5.1 Métodos de Imobilização

O desenvolvimento de técnicas de imobilização é importante pois proporciona a reutilização das enzimas, facilita a separação dos produtos e pode aumentar a estabilidade térmica e em solventes orgânicos (VIEIRA, 2009).

As enzimas podem ser imobilizadas por aprisionamento físico ou por adsorção na superfície. No primeiro método, as enzimas são encapsuladas em esferas ou matrizes de polissacarídeos, proteínas ou polímeros sintéticos. As enzimas podem ser fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (MEERSMAN, 1992). O método de adsorção física para imobilização de enzimas é baseado em adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima pode ser retida na superfície do suporte insolúvel e essa interação pode ser ocasionada por ligações hidrofóbicas, interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações específicas. A adsorção de proteínas sobre superfícies sólidas pode ocorrer por interações hidrofóbicas, interações

eletrostáticas ou ligações de pontes de hidrogênio (MUGURUMA et al., 2006; CUNHA et al., 2007). Este método apresenta baixo custo, poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima (VILLENEUVE et al., 2000), mas pode ocorrer a dessorção da enzima durante a sua utilização.

Nas reações que ocorrem em meio orgânico, não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte. Nestas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso, sendo que este método é de baixo custo porque não é necessário ativar o suporte e o mesmo pode ser utilizado em vários ciclos (SECUNDO et al., 2008).

2.5.1.1 Imobilização por adsorção

A quitosana é um suporte que tem sido descrito para a adsorção de enzimas e apresenta características desejáveis como biocompatibilidade, hidrofiliidade, biodegradabilidade e propriedades anti-bacterianas. Além disso, é um biopolímero abundante na natureza (WU et al., 2002).

CHAMPLUVIER et al., (1988) imobilizaram células de levedura *K. fragilis* e *K. lactis* em quitosana e a atividade enzimática encontrada para a enzima β -galactosidase foi de 0,9 – 2,2 U/mg por massa seca das células. GAUER et al., (2006) imobilizaram a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em quitosana e obtiveram 18,4% de recuperação da enzima.

CABUK et al., (2014) imobilizaram a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em matriz de quitosana – hidroxiapatita e não encontraram alteração da temperatura ótima de atividade da enzima livre a 37°C quando comparada com a da forma imobilizada. Porém, entre 40 e 50°C, a enzima imobilizada apresentou 87,2% a 55,6% de atividade relativa, enquanto a enzima livre apresentou uma redução significativa de 61,2% a 30,3%.

2.5.1.2 Imobilização por ligação covalente

A imobilização de enzimas por ligação covalente, usualmente envolve dois passos, a ativação do suporte e a ligação da enzima ao suporte. É um dos métodos mais empregados para imobilização da β -galactosidase (GEKAS, LÓPEZ – LEIVA, 1985). Este método de imobilização consiste na retenção da enzima na superfície do suporte pela formação de ligações covalentes. As moléculas de enzimas se ligam ao suporte por meio de certos grupos funcionais, tais com amino, carboxila, hidroxila e grupos sulfidrilos. É aconselhável realizar a imobilização na presença do substrato ou inibidor competitivo da enzima com o objetivo de proteger os sítios ativos (PANESAR et al., 2010).

Este método pode conferir maior resistência à desnaturação pela temperatura, por solventes orgânicos ou pH, pois aumenta a estabilidade da estrutura terciária da enzima (ARROYO, 1998). As desvantagens deste método são o alto custo e baixo rendimento devido à exposição do biocatalisador a reagentes tóxicos ou condições severas de reação (GROSOVÁ et al., 2008). Uma das matrizes utilizadas para este método de imobilização é o Eupergit[®] C, que consiste em um suporte na forma de microesferas macroporosas, desenvolvido por meio da copolimerização de N, N' – metileno-bis-metacrilamida, glicidilmetacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida. Este suporte apresenta boas características sendo estável em qualquer valor de pH, é mecanicamente estável, uma vez que não apresentou nenhum desgaste após 650 ciclos de operação em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000 L (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000). Este suporte já foi estudado para imobilização de várias enzimas: β -galactosidase de *Bacillus circulans*, β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, para transformar lactose em glicose e galactose, ou produzir galactooligossacarídeos (HERNAIZ & CROUT, 2000). CAMPELLO (2010) obteve uma média de 41,86% da atividade inicial após imobilização da β -galactosidase em Eupergit[®] C.

ZHOU & CHEN (2001) imobilizaram β -galactosidase de *K. lactis* em placas de grafite por meio da formação da base de Schiff entre grupos ativados da superfície do suporte e a enzima utilizando glutaraldeído para promover a reticulação. A

imobilização aumentou a estabilidade térmica e deslocou o pH ótimo para valores mais alcalinos (7,7) comparado com a enzima livre (6,6).

SERIO et al., (2003) estudaram o comportamento da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* (*Saccharomyces*) *lactis*, imobilizada por ligação covalente em diferentes óxidos: alumina, sílica e alumina silicada. Os autores observaram que quando o tamanho de partícula dos suportes era aumentado, a atividade enzimática diminuía drasticamente ocorrendo um baixo rendimento (não excedendo 5%) na retenção da atividade enzimática, explicada pelo bloqueio dos poros do suporte com as moléculas de enzima antes da adição de glutaraldeído.

ROY & GUPTA (2003), imobilizaram a β -galactosidase comercial LactozymTM de *Kluyveromyces fragilis*, em esferas de celulose com epícloridrina. A enzima hidrolisou a lactose do soro de leite (>90%) em leite fluidizado após 5 horas. A enzima imobilizada foi reutilizada por 3 vezes sem mudança na performance do reator de leite fluidizado. Cerca de 60% da lactose pode ser hidrolisada em leite fluidizado após 5 horas.

2.5.1.3 Imobilização por encapsulação

A imobilização de enzimas por aprisionamento em matrizes de biopolímeros pode aumentar a estabilidade da enzima, sendo esse um dos fatores primordiais em aplicações industriais. Neste método, as enzimas são mantidas dentro de um espaço confinado, com restrita mobilidade que contribui para sua maior estabilidade (EGGERS & VALENTINE, 2011; ZHOU & DILL, 2001). As vantagens deste método são a maior proteção da enzima contra condições extremas de pH e a matriz pode evitar a evasão da enzima durante a catálise. Essas vantagens são importantes tanto economicamente quanto do ponto de vista ambiental (KOKUFUTA et al., 1988; DUMITRIU & CHORNET, 1998). Entre os diversos suportes utilizados para o aprisionamento da enzima, o alginato tem mostrado características adequadas para este método.

No método de encapsulação, a enzima é imobilizada no interior de esferas, cujo envoltório é constituído por um polímero gelatinoso e semipermeável, como o alginato (LIMA et al., 2001; GEORGE E ABRAHAM, 2006).

Alginato de sódio é um sal de sódio de ácido algínico e é um polímero aniônico solúvel em água. O ácido algínico é um conhecido polissacarídeo natural extraído de algas marinhas marrons principalmente da *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens* e *Durvillaea antarctica* constituído por polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico. A composição do alginato varia de acordo com as condições sazonais e de crescimento e bem como das diferentes partes da planta utilizadas na extração (KADOKAWA et al., 2005).

Os alginatos são usados na indústria de alimentos devido as suas características de retenção de água, propriedades gelificantes e estabilizantes e a capacidade para modificar a viscosidade dos sistemas aquosos onde é incorporado. Outras duas importantes aplicações do alginato são na indústria farmacêutica e na indústria têxtil (SANTOS, 2012).

Na indústria farmacêutica o alginato é utilizado para imobilização de vários produtos atuando como excipiente de liberação de medicamentos, curativos inteligentes, em formulações para prevenção de refluxo gástrico, bem como materiais de impressão dental (MÜLLER et al., 2011).

A utilização do alginato na indústria têxtil melhora o desempenho das tintas utilizadas nos processos de impressão favorecendo a aderência e a deposição destes materiais sobre os tecidos. Na indústria de papel a adição de alginato permite que as propriedades para impressão destes materiais também melhorem (SABRA et al., 2001).

Também é possível realizar a manipulação das características dos alginatos por fracionamento químico ou por modificação enzimática *in vitro* (SANTOS, 2012).

Em termos moleculares, o alginato é um polissacarídeo linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) interligados por ligações glicosídicas do tipo 1→4 de composição e

estrutura sequencial amplamente variável (SOUZA, 2006; SANTOS, 2012). Estes monômeros podem ser organizados em cadeias consecutivas de resíduos G, de resíduos M, ou alternando resíduos M e G (Figura 3).

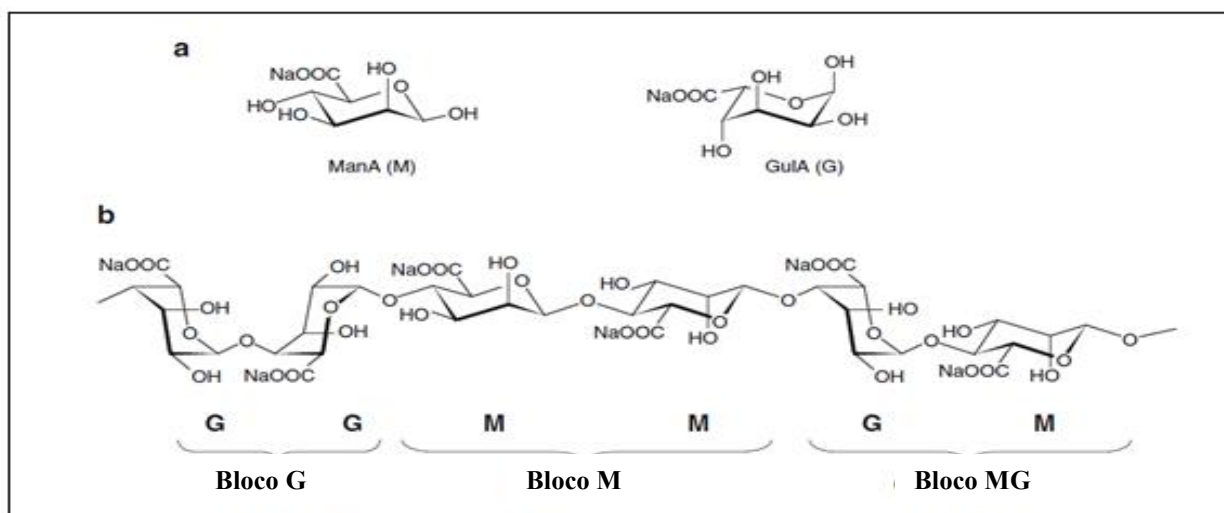


Figura 3. Estrutura química do alginato. (a) Conformação do β -D-ácido manurônico (M) e conformação do α -L – ácido gulurônico (G); (b) Composição dos blocos de alginato G – blocos, M – blocos e MG – blocos (REHM, 2009).

Geralmente, as duas unidades monoméricas de ácido manurônico e ácido gulurônico, estão presentes numa razão M/G de 1,5, mas devido as diferentes proporções de monômeros existentes, os alginatos são comumente denominados alginatos *high-M* ou *high-G* (BELITZ, 2009).

As diferentes sequências de blocos MG e GG é que irão determinar a flexibilidade da cadeia, influenciando a solubilidade e estabilidade do gel que será formado (ESTESVAG & VALLA, 1998; TEIXEIRA, 2011; KLEIN et. al., 1983; ESTESVAG & VALLA, 1998; CHAN et al., 2002). Os blocos G formam cadeias rígidas em que duas cadeias G, com mais de seis resíduos cada uma podem ser ligados por íons divalentes levando a formação de gel que exibem alta porosidade e baixo encolhimento durante a formação do gel, porém, tem maior propensão em apresentar sinérese. Com o aumento da quantidade de blocos M, os géis tornam-se mais macios e apresentam poros de menor tamanho (KAWAGUTI, 2007).

Uma das excelentes propriedades do alginato é sua habilidade em formar hidrogéis na presença de cátions divalentes (HAIR et al., 1996; WANG et al., 2003). A formação fácil e quase instantânea de géis iônicos de alginatos, na presença de cátions adequados, constitui uma das suas propriedades mais importantes. O efeito do íon cálcio tem sido o mais estudado nas aplicações alimentares, devido à sua importância biológica (SANTOS, 2012).

Para formar um gel, o alginato deve conter um número suficiente de monômeros gulurônicos para poder reagir com um cátion. A gelificação do alginato é principalmente alcançada pela troca de íons por cátions divalentes, tais como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+} . Existe uma concordância que a rede de gel, induzida pela ligação do íon Ca^{2+} e pela cadeia de segmentos do grupo G, formam uma rede tridimensional onde o íon cálcio encaixa-se nas estruturas dos resíduos de ácido gulurônico, conforme o modelo caixa de ovos ilustrado na Figura 4 (ROY & GUPTA, 2004; SANTOS, 2012).

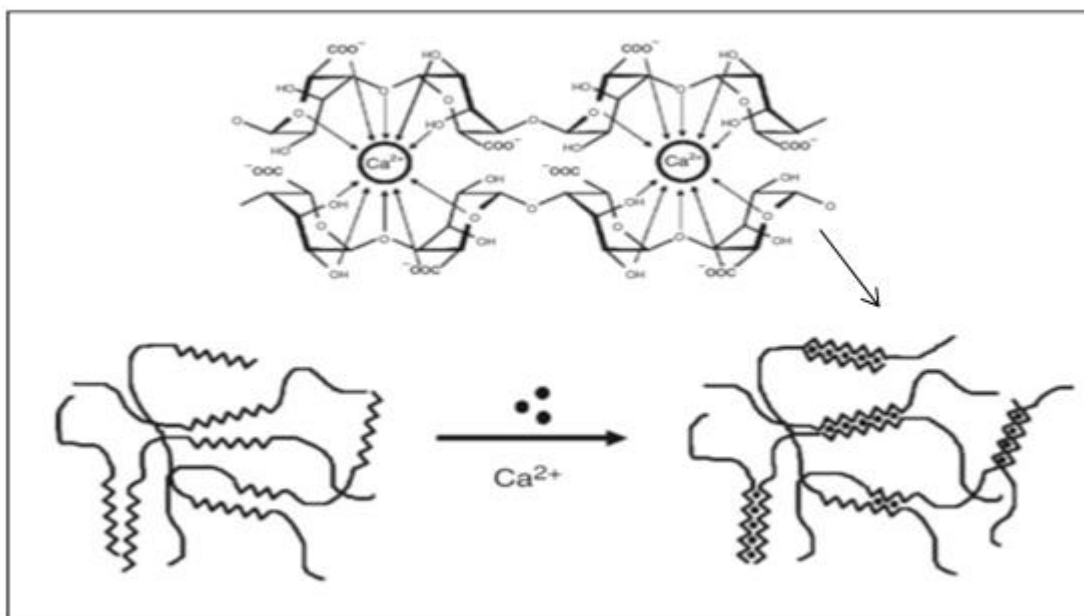


Figura 4. Ilustração da complexação de cadeias de alginato e íons cálcio e formação de gel (REHM, 2009).

Entre as desvantagens do uso deste polímero como suporte para imobilização podemos citar sua instabilidade química na presença de agentes quelantes do íon cálcio (fosfatos, lactato e citrato), as limitações de transferência de substratos e produtos e a tendência das esferas sofrerem dilatação na presença de cátions monovalentes (FREEMAN E LILLY, 1998).

O procedimento clássico de imobilização consiste em dissolver a enzima em uma solução aquosa em alginato de sódio, que é então gotejada sobre uma solução aquosa contendo íons bivalentes (Ca^{2+} , por exemplo). Em contato com a solução CaCl_2 , a gota de alginato de sódio forma esfera de alginato de cálcio na qual a enzima fica aprisionada (LIMA, et al., 2001).

As interações iônicas entre blocos de guluronato e íons cálcio causam a formação de gel forte e termoestável com propriedades que dependem amplamente das características do polímero e dos métodos de preparação. O sucesso desse método simples de encapsulação é devido as condições brandas necessárias e ao baixo custo de processo (STORKER, et al., 1991).

HAIDER & HUSAIN (2007) imobilizaram a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em uma mistura de alginato de cálcio e concanavalina A obtendo um melhor resultado para imobilização da enzima comparada com sua forma livre. A atividade máxima da β -galactosidase foi obtida a 60°C , aproximadamente 10 graus acima da temperatura de atividade da enzima livre. A β -galactosidase imobilizada reteve 61%, 50% e 43% de atividade na presença de 5% de CaCl_2 , 5% de galactose e 4M de ureia, respectivamente, quando incubadas durante 1 h a 37°C . A preparação de β -galactosidase imobilizada foi superior à enzima livre na hidrólise da lactose no soro ou leite em processo descontínuo: hidrolisou 89% da lactose no soro em 3 h e 79% da lactose no leite em 4 h. A β -galactosidase imobilizada manteve 61% de sua atividade original após 2 meses de armazenamento a 4°C , enquanto a enzima solúvel mostrou apenas 37% da atividade inicial em condições idênticas.

Um estudo de imobilização da enzima β -galactosidase de *A. oryzae* em alginato – gelatina reticulada com glutaraldeído mostrou que a enzima permaneceu estável na faixa de pH 4,5 a 7,0. A enzima livre e imobilizada apresentaram perfis semelhantes de atividade residual frente a diferentes temperaturas, entretanto a

temperatura de atividade máxima da enzima imobilizada aumentou de 55°C para 60°C, apresentando maior tolerância a altas temperaturas (FREITAS et al., 2011).

NAGANAGOUDA & MULIMANI (2006) estudaram a imobilização da enzima α -galactosidase em alginato – gelatina e glutaraldeído e observaram que as condições ótimas de pH e temperatura de atividade não foram afetadas com a imobilização da enzima. Para enzima livre e imobilizada os valores ótimos de pH e temperatura de atividade encontrados foram de 4,8 e 50°C, respectivamente. Os autores verificaram diferença significativa durante o armazenamento sendo que a enzima livre perdeu a atividade após 5 dias a 4°C enquanto que a enzima imobilizada reteve 30% da atividade inicial após 60 dias a 4°C.

O alginato de cálcio foi utilizado também para imobilização de células de *Lactobacillus casei* para produção de ácido láctico (YOO et al., 1996), *K. lactis* para hidrólise da lactose (BECERRA et al., 2001), e *Giberella fujikuroi* para obtenção de carotenóides (GARBAYO et al., 2003).

Matrizes de álcool-polivinílico (PVA) têm sido utilizadas para obtenção de géis estáveis química e mecanicamente, fornecendo uma alternativa adequada para superar as desvantagens dos polímeros naturais mantendo os benefícios inerentes ao seu uso (EL-HADI, 2003; SCHLIEKER & VORLOP, 2006).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para formar hidrogéis a partir de álcool-polivinílico (PVA), através de congelamento-descongelamento, irradiação ou ligação química cruzada. Uma abordagem diferente, a qual tem aplicação comercial, depende da secagem controlada do hidrogel de PVA (líquido de Lentikats) e subsequente estabilização química, promovendo a formação de partículas com formato de lentes (VORLOP & JEKKELE, 1999). Sendo que esta técnica já foi validada para utilização para aplicação em indústrias alimentícias e farmacêuticas (Lentikat's Biotechnologies).

FERNANDES et al., (2009) descreveram um método de imobilização de enzimas em partículas de PVA por meio da extrusão de líquido de Lentikats® em polietilenoglicol. A inulinase comercial, com atividade de invertase foi usada como sistema modelo para imobilização em partículas de PVA. A faixa de pH ótimo da enzima imobilizada foi ampliada para valores mais baixos de pH. Foi observada

instabilidade mecânica do PVA em incubação prolongada em temperaturas superiores a 55°C. Foi observado um aumento de 1,8 vezes no valor de Km aparente sugerindo a limitação da difusão devido à imobilização.

GROSOVÁ et al., (2008) descreveram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em cápsulas de álcool-polivinílico (PVA), na forma de lentes e obtiveram 32% da atividade original. A imobilização não alterou o pH ótimo de atividade da enzima (pH 4,5). Foi observado um aumento da atividade relativa da β -galactosidase imobilizada em relação a enzima livre, nos ensaios de inibição pelo produto. Foi verificado que não houve decréscimo da atividade da enzima imobilizada durante 35 bateladas repetidas e durante 530h de hidrólise contínua da lactose. A β -galactosidase imobilizada mostrou-se estável após 14 meses de estocagem 4°C e pH 4,5.

A β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em lentes de PVA - Lentikats® apresentou-se mais estável do que a enzima livre, após 3 h de tratamento na faixa de 45 a 55°C e a imobilização não alterou o pH ótimo de atividade da enzima, permanecendo em 4,5. A taxa de conversão relativa da solução 1,5mM de celobiose em tampão acetato 0,5 mM pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats® em coluna de 1,0 cm³ e fluxo de 0,3 mL/min foi de 100% após 5 h entretanto a porcentagem de conversão diminuiu para 40% após 148 h (ANGELOTTI, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram utilizadas três preparações comerciais líquidas de diferentes fornecedores da β -galactosidase ativas em pH neutro denominadas A, B e C sendo as enzimas A e B obtidas da levedura *Kluyveromyces lactis* (2000 U/mL) e a enzima C obtida da levedura *Saccharomyces marxianus* var. *lactis* (2000 U/mL) e uma preparação comercial em pó da enzima β -galactosidase obtida do fungo *Aspergillus oryzae* (2500 U/g) denominada D, ativa em pH ácido.

Para imobilização das β -galactosidases foram testados três alginatos de sódio: (I) Alginato Synth-A1089.01AF, (II) Alginato 20.000 cP Sigma[®]-180947 [M/G=1,56] e (III) Alginato 14000 cP Sigma[®]-A7128 [M/G=1,56]. A gelatina foi adquirida da Merck. A enzima transglutaminase ACTIVA TG[®] da Ajinomoto foi utilizada como agente reticulante.

Foram utilizados lactose Synth e Kit enzimático de determinação de glicose da marca BioLiquid Glicose.

3.2 Estudo da imobilização da β - galactosidase

3.2.1 Seleção dos suportes para imobilização da enzima β -galactosidase em alginato de cálcio

Para o estudo da imobilização da β -galactosidase em diferentes tipos de alginatos de sódio foram utilizados (I) Alginato Synth-A1089.01AF, (II) Alginato 20.000 cP Sigma-180947 [M/G=1,56], (III) Alginato 14000 cP Sigma-A7128

[M/G=1,56] e a β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*) e ácida D (*A. oryzae*). O alginato de sódio mais adequado foi utilizado para testes subsequentes de imobilização da enzima utilizando planejamento fatorial fracionado.

3.2.1.1 Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes tipos de alginato

Amostras contendo 10 mL de suspensão de alginato de sódio 1,7% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0 para β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*) ou tampão acetato 0,05M pH 4,5 para β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) foram aquecidas em placa de aquecimento com agitador magnético até a solubilização dos reagentes. As misturas foram resfriadas até temperatura ambiente e foi adicionado 2 mL de solução (200 U/mL) β -galactosidase neutra C ou 2 mL de solução (200 U/mL) β -galactosidase ácida D. Com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] L/S (Cole-Parmer Instruments Co. Vernon Hills, IL, EUA), a suspensão foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,25M para formação dos grânulos de hidrogel, os quais foram mantidos imersos sob agitação por 2 horas. Os grânulos foram armazenados por 12h, sob refrigeração de 4°C e posteriormente lavados com água destilada para remoção do excesso de CaCl₂. Os grânulos foram armazenados em água destilada a temperatura de 4°C até posterior utilização (adaptado de CARVALHO, 2013).

3.2.1.1.1 Estudo da reutilização da enzima β -galactosidase imobilizada em diferentes tipos de alginato

A reutilização das amostras de β -galactosidase neutra C imobilizadas, foram testadas utilizando-se 3 g de enzima imobilizada e 20 mL de solução 5% de lactose em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 à 35°C durante 3 bateladas de 60 minutos cada. Enquanto que a reutilização das amostras de β -galactosidase ácida D, foram

testadas utilizando-se solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05M pH 4,5 à 45°C durante três bateladas de 60 minutos cada.

3.2.1.2 Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase neutra e ácida em diferentes tipos de alginato com adição de gelatina e TGase

Amostras contendo 10 mL de suspensão de alginato de sódio 1,7% (m/v) e gelatina 0,5% (m/v) em tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0 para β -galactosidase neutra C ou tampão acetato 0,05M pH 4,5 para β -galactosidase ácida D foram aquecidas em placa de aquecimento com agitador magnético até a solubilização dos reagentes. A mistura foi resfriada até temperatura ambiente e foi adicionado 3,5% (m/v) da enzima transglutaminase. A mistura foi agitada com auxílio de barra magnética e agitador magnético e foi adicionado 2 mL de solução (200 U/mL) de β -galactosidase neutra C ou 2 mL de solução (200 U/mL) de β -galactosidase ácida D. Com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] L/S (Cole-Parmer Instruments Co. Vernon Hills, IL, EUA), a suspensão foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,25M para formação dos grânulos de hidrogel, os quais foram mantidos imersos sob agitação por 2 horas. Os grânulos foram armazenados por 12 h, sob refrigeração de 4°C e posteriormente lavados com água destilada para remoção do excesso de CaCl₂. Os grânulos foram armazenados em água destilada a temperatura de 4°C até posterior utilização (adaptado de CARVALHO, 2013).

3.2.2 Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) - Lentikats[®]

3.2.2.1 Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) – lentes de Lentikats®

A imobilização da enzima foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.genialab.de/download/tt-english.pdf>). O líquido de Lentikats® (álcool polivinílico – PVA) foi aquecido a 95°C e em seguida resfriado até aproximadamente 40°C. Em um béquer foram misturados 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase C ou D, e 2 mL de líquido de Lentikats® a 40°C e a mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético.

A mistura foi transferida para uma seringa com agulha (20Gx2”) e a mistura foi gotejada na forma de gotas em placas de petri, previamente taradas. As placas de petri foram pesadas e armazenadas a 30°C para desidratação das gotas. O teor de umidade final de 28% foi atingido após aproximadamente 2,5 horas. Em seguida as lentes foram transferidas para um béquer contendo 100 mL de solução estabilizadora (15g/L) para curar as lentes durante 2 horas.

As lentes PVA-Lentikats® foram peneiradas e armazenadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 durante 30 minutos para a β -galactosidase C, e para β -galactosidase D as lentes foram peneiradas e armazenadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5 durante 30 minutos. Após esse período as lentes foram novamente peneiradas e armazenadas em um frasco contendo solução estabilizadora a 5°C para posterior utilização.

3.2.2.2 Imobilização de β -galactosidase em álcool polivinílico (PVA) – Lentikats® - esferas

O líquido de Lentikats® foi aquecido a 95°C e em seguida resfriado até aproximadamente 40°C. Em um béquer foram misturados 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase C ou D e 2 mL de líquido de Lentikats® a 40°C e a mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético.

A mistura foi transferida para uma seringa com agulha (20 Gx2") e gotejada em um béquer contendo 100 mL da solução de PEG 600 (polietilenoglicol) sob agitação lenta durante 2 horas. Em seguida as esferas contendo β -galactosidase C imobilizada foram peneiradas e lavadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e as esferas contendo β -galactosidase D imobilizada foram lavadas em tampão acetato 0,1M pH 4,5. As amostras de enzima imobilizada foram armazenadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 (enzima C - *S. marxianus* var *lactis*) e tampão acetato 0,1M pH 4,5 (enzima D - *A. oryzae*) a 5°C durante 12 horas para curar.

3.2.2.2.1 Estudo da reutilização da enzima β -galactosidase imobilizada em Lentikats® - esferas e lentes

A atividade das amostras de β -galactosidase neutra C imobilizadas em Lentikats® - esferas e lentes, foram testadas utilizando-se 43 e 12 mg de enzima imobilizada, respectivamente, e 400 μ L de solução 5% de lactose em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 à 35°C durante 3 bateladas de 60 minutos cada. Enquanto que a reutilização das amostras de β -galactosidase ácida D, foram testadas utilizando-se solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05M pH 4,5 à 45°C durante três bateladas de 60 minutos cada. Os resultados foram comparados com amostras das β -galactosidases neutra e ácidas imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase preparadas como descrito no item 3.2.1.1.

3.3 Determinação da atividade de β -galactosidase

3.3.1 Determinação da atividade enzimática da β -galactosidase neutra e ácida, na forma livre

Para a determinação da atividade das β -galactosidases A (*K. lactis*), B (*K. lactis*), e C (*S. marxianus* var *lactis*), ativas em pH neutro, obtidas de leveduras, na forma livre, uma alíquota de 200 μ L da solução (200 U/mL) β -galactosidase foi adicionada em tubos de ensaio contendo 20 mL de solução 5 % de lactose em solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 7,0, previamente incubados a 35°C. Os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 35°C por 15 minutos com agitação. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi quantificada utilizando-se kit de determinação de glicose por método enzimático, como descrito no item 3.3.1.1.

A atividade da β -galactosidase comercial D, ativa em pH ácido, obtida de *Aspergillus oryzae* foi determinada incubando-se tubos de ensaio contendo a mistura de 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase e 20 mL de solução 5% de lactose em solução tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,5 em banho-maria a 45°C por 15 minutos sob agitação. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi quantificada utilizando-se kit de determinação de glicose por método enzimático.

3.3.1.1 Determinação de glicose por método enzimático

A concentração de glicose foi determinada utilizando-se o Kit Bioliquid Glicose. Uma alíquota de 0,1mL da mistura de reação foi incubada com 1 mL de reagente colorimétrico por 15 minutos em banho-maria com agitação a 35°C. A absorbância da mistura foi medida a 505nm em espectrofotômetro Beckman DU 70. Uma curva padrão de glicose foi previamente preparada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio (adaptado de SZCZODRAK, 2000).

3.3.2 Determinação da atividade enzimática das β -galactosidases neutras e ácida na forma imobilizada

A atividade das β -galactosidases A, B e C imobilizadas em alginato-gelatina-TGase, ativas em pH neutro, foram determinadas incubando-se tubos de ensaio contendo misturas de 1,5 g de grânulos da enzima imobilizada em 20 mL de solução 5% de lactose em solução tampão fosfato 0,05M pH 7,0 em banho-maria a 35°C por 15 minutos com agitação. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada como descrito no item 3.3.1.1.

A atividade da β -galactosidase ácida, obtida de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em alginato-gelatina-TGase foi determinada incubando-se tubos de ensaio contendo a mistura de 1,5 g de grânulos da enzima imobilizada em 20 mL de solução 5% de lactose em solução tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,5 em banho-maria a 45°C por 15 minutos com agitação. A reação foi interrompida pela incubação em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada conforme descrito no item 3.3.1.1.

3.4 Estudo das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 , gelatina, TGase na imobilização da β -galactosidase em alginato de cálcio-gelatina-TGase utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Foram estudados os efeitos da concentração das variáveis alginato de sódio, CaCl_2 , TGase, gelatina e β -galactosidase C (*Saccharomyces marxianus var. lactis*) na imobilização da enzima, utilizando planejamento fatorial 2^{5-1} , com triplicatas no ponto central totalizando 19 ensaios. Os dados foram analisados utilizando o software Statistica® 7.0.

Tabela 2. Valores codificados dos níveis utilizados das variáveis no planejamento experimental fatorial fracionado 2^{5-1} para otimização da composição da matriz de imobilização das β -galactosidases comerciais.

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	1
Alginato de Sódio % (m/v)	x1	1	2	3
CaCl ₂ (M)	x2	0,1	0,2	0,3
Enzima Tgase % (m/v)	x3	0	0,5	1
Gelatina % (m/v)	x4	0	0,5	1
β – galactosidase % (v/v)	x5	10	20	30

A Tabela 3 apresenta os valores codificados das variáveis do planejamento fatorial fracionado.

Tabela 3. Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} codificado com as combinações experimentais para estudo dos efeitos da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , enzima TGase, gelatina e β -galactosidase C, na imobilização.

ENSAIOS	X1	X2	X3	X4	X5
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

3.4.1 Imobilização das enzimas β -galactosidases em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TGase após o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Misturas de 2 g de alginato de sódio (14000 cP Sigma-A7128) e 1 g de gelatina foram diluídas em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0 para as β -galactosidases neutras A, B e C ou 2 g de alginato de sódio e 1g de gelatina foram diluídas em 100 mL tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,5 para a β -galactosidase ácida D. As misturas foram aquecidas em placa de aquecimento até a

solubilização dos reagentes. A mistura foi resfriada até temperatura ambiente e 0,5 g da enzima transglutaminase ACTIVA TG[®] foi adicionada ao béquer. As misturas foram agitadas com auxílio de barra magnética e agitador magnético e em seguida foi adicionado 30 mL de solução (600 U/mL) de β -galactosidase C ou D. Com auxílio de uma bomba peristáltica MasterFlex[®] L/S (Cole-Parmer Instruments Co. Vernon Hills, IL, EUA), a suspensão foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 0,20M para formação dos grânulos de hidrogel, os quais foram mantidos imersos sob agitação por 2 horas. Os grânulos foram armazenados por 12h, sob refrigeração de 4°C e posteriormente lavados com água destilada para remoção do excesso de CaCl₂. Os grânulos foram armazenados em água destilada a temperatura de 4°C até posterior utilização.

3.4.2 Eficiência de imobilização

A eficiência de imobilização (E.I) foi calculada determinando-se a atividade β -galactosidase nas 19 amostras de enzima imobilizada no planejamento fatorial fracionado e a atividade de β -galactosidase livre, conforme a Equação abaixo:

$$E.I (\%) = \frac{\text{Atividade enzimática da } \beta - \text{galactosidase imobilizada}}{\text{Atividade enzimática da } \beta - \text{galactosidase livre}} \times 100$$

3.5 Caracterização das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

3.5.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

3.5.1.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras , nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

O efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras A, B e C foi testado incubando-se tubos de ensaio contendo misturas de 200 μ L da solução (200 U/mL) de β -galactosidase neutras A, B e C na forma livre ou 1,5 g de β -galactosidases neutras A, B e C na forma imobilizada e 20 mL de solução 5% de lactose em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 em banho-maria a 4, 10, 15, 25, 30, 35, 40 e 45°C por 15 minutos com agitação. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada conforme descrito no item 3.3.1.1.

3.5.1.2 Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

O efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase ácida D, obtida de *Aspergillus oryzae* foi testado incubando-se tubos de ensaio contendo misturas de 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase ácida D na forma livre ou 1,5 g de β -galactosidase D imobilizada e 20 mL de solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05M pH 4,5 em banho-maria a 4, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 e 70°C por 15 minutos com agitação. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada como descrito no item 3.3.1.1.

3.5.2 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

3.5.2.1 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Para a determinação do efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutra na forma livre, tubos de ensaio contendo 10 mL de solução (200 U/mL) β -galactosidases A, B e C em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 foram incubados nas temperaturas de 35, 40 e 45°C e alíquotas de 200 μ L foram retiradas a cada 1 hora até 6 horas de incubação. A atividade residual de β -galactosidase foi determinada como descrito no item 3.3.1 utilizando-se 5% de lactose em tampão fosfato 0,05M pH 7,0.

Para a determinação do efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras, na forma imobilizada, tubos de ensaio contendo 1,5 g de enzima imobilizada em 10 mL de tampão fosfato 0,05M pH 7,0 foram incubados nas temperaturas de 35, 40 e 45°C por 6 horas. Após cada 1h de incubação 2 tubos foram centrifugados a 6.000 rpm e a atividade residual de β -galactosidase na enzima imobilizada foi determinada como descrito no item 3.3.2, utilizando-se 5% de lactose em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0.

3.5.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Para a determinação do efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidase ácida na forma livre, tubos de ensaio contendo 10 mL de solução (200 U/mL) de β -galactosidase ácida D em tampão acetato 0,05M pH 4,5 foram incubadas nas temperaturas de 35, 40 e 45°C e alíquotas de 200 μ L foram retiradas a cada 1 hora até 6 horas de incubação. A atividade residual de β -galactosidase foi

determinada como descrito no item 3.3.1, utilizando-se solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05 M pH 4,5.

Para a determinação do efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidase ácida imobilizada, tubos de ensaio contendo 1,5 g de enzima imobilizada em 10 mL de tampão acetato 0,05M pH 4,5 foram incubados nas temperaturas de 35, 40 e 45°C por 6 horas. Após cada 1h de incubação 2 tubos de ensaio foram centrifugados a 6.000 rpm e a atividade residual de β -galactosidase nos grânulos de enzima imobilizada foi determinada conforme descrito no item 3.3.2 utilizando-se solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05 M pH 4,5.

3.5.3 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras e ácidas, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

3.5.3.1 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Tubos de ensaio contendo misturas de 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase A, B e C na forma livre ou 1,5 g de β -galactosidase A, B e C na forma imobilizada e 20 mL de solução de lactose 5% em tampão acetato 0,05M pH de 5,0; 5,5 ou tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 foram incubados a 35°C em banho-maria com agitação por 15 minutos. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada conforme descrito no item 3.3.1.1.

3.5.3.2 Estudo do pH na atividade da enzima β -galactosidase ácida, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Tubos de ensaio contendo misturas de 200 μ L de solução (200 U/mL) de β -galactosidase ácida D, obtida de *Aspergillus oryzae*, na forma livre ou 1,5 g de β -galactosidase D, na forma imobilizada e 20 mL de solução 5% de lactose em solução tampão acetato 0,05M pH 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 ou tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0 e 7,0 foram incubados a 45°C em banho-maria com agitação por 15 minutos. A reação foi interrompida pela incubação dos tubos de ensaio em banho de gelo e a glicose liberada foi determinada como descrito no item 3.3.1.1.

3.5.4 Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácida, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase

3.5.4.1 Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Para a determinação do efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutra na forma livre, tubos de ensaio contendo 10 mL de solução (200 U/mL) de β -galactosidases A, B e C em tampão fosfato 0,05M pH 6,5; 7,0 e 7,5 a 35°C e alíquotas de 200 μ L foram retiradas a cada hora, até 6 horas de incubação. Em seguida foi adicionado 20 mL de solução 20% de lactose em tampão fosfato 0,2M pH 7,0 a atividade residual foi determinada como descrito no item 3.3.1.

Para a determinação do efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras na forma imobilizada, tubos de ensaio contendo 1,5 g de β -galactosidases neutras A, B e C imobilizada foram incubados em 10 mL de tampão fosfato 0,05M pH 6,5; 7,0 e 7,5 à 35°C durante 6 horas de incubação. Dois tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 2 minutos e a atividade residual de β -galactosidase imobilizada foi determinada adicionando-se 20 mL de solução de lactose em tampão fosfato 0,2M pH 7,0 como descrito no item 3.3.2.

3.5.4.2 Efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

Para a determinação do efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida na forma livre tubos de ensaio contendo 10 mL de β -galactosidase D em tampão acetato 0,05M pH 4,0, 4,5 e 5,0 foram incubados à 45°C. Alíquotas de 200 μ L das soluções enzimáticas foram retiradas a cada 1 hora, durante o período de 6 horas. Em seguida 20 mL de solução de lactose 5% em tampão acetato 0,05 M pH 4,5 foram adicionados aos tubos de ensaio e a atividade residual foi determinada como descrito no item 3.3.1.

Para a determinação do efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida na forma imobilizada, tubos de ensaio contendo 1,5 g de β -galactosidase ácida D imobilizada foram incubados em 10 mL de tampão fosfato 0,05M pH 4,0; 4,5 e 5,0 a 45°C durante 6 horas de incubação. Dois tubos de ensaio foram centrifugados a 6000 rpm por 2 minutos e a atividade residual de β -galactosidase foi determinada nos grânulos de enzima imobilizada adicionando-se 20 mL de solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05M pH 4,5 como descrito no item 3.3.2.

3.5.5 Estudo da reutilização das β -galactosidases neutra (*S. marxianus* var *lactis*) e ácida (*A. oryzae*) imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase em sistema de batelada

Para determinação da vida útil da β -galactosidase neutra C obtida de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis* imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase, tubos de ensaio contendo 1,5 g de enzima imobilizada foram incubados em 20 mL de solução 5% de lactose em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 à 35°C durante 6 horas e em seguida foram testadas 3 bateladas 6h/dia durante 3 dias, trocando-se a solução 5% de lactose em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 ao final de cada batelada e para a enzima ácida D de *Aspergillus oryzae*, tubos de ensaio contendo 1,5 g de enzima imobilizada foram incubados em 20 mL de solução 5% de lactose em

tampão acetato 0,05M pH 4,5 à 45°C durante 6 horas e em seguida foram testadas 3 bateladas (6h/dia) durante 3 dias, trocando-se a solução 5% de lactose em tampão acetato 0,05M pH 4,5 ao final de cada batelada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção dos suportes para imobilização das enzimas β -galactosidase neutra e ácida

4.1.1 Estudo da imobilização da enzima β -galactosidase em diferentes tipos de alginato

A imobilização da enzima β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*) e da enzima ácida D (*A. oryzae*) em diferentes tipos de alginatos sem e com adição de gelatina e com a reticulação pela enzima transglutaminase foi testada como descrito no item 3.2.1.

Entre os três alginatos de sódio [(I) Alginato Synth-A1089.01AF, (II) Alginato 20.000 cP Sigma-180947 [M/G=1,56], (III) Alginato 14000 cP Sigma-A7128 [M/G=1,56] foi obtido maior atividade de β -galactosidase C utilizando-se a enzima imobilizada no alginato III para a 1ª, 2ª e 3ª batelada de 60 minutos em pH 7,0 à 35°C (Figura 5). Considerando-se o valor 100% de atividade enzimática para enzima livre, foram obtidos respectivamente, 87, 42 e 18% de atividade enzimática para a 1ª, 2ª e 3ª batelada, respectivamente (Figura 5). A imobilização da β -galactosidase em alginato de cálcio diminuiu a atividade enzimática devido aos possíveis efeitos de transferência do substrato no interior do gel.

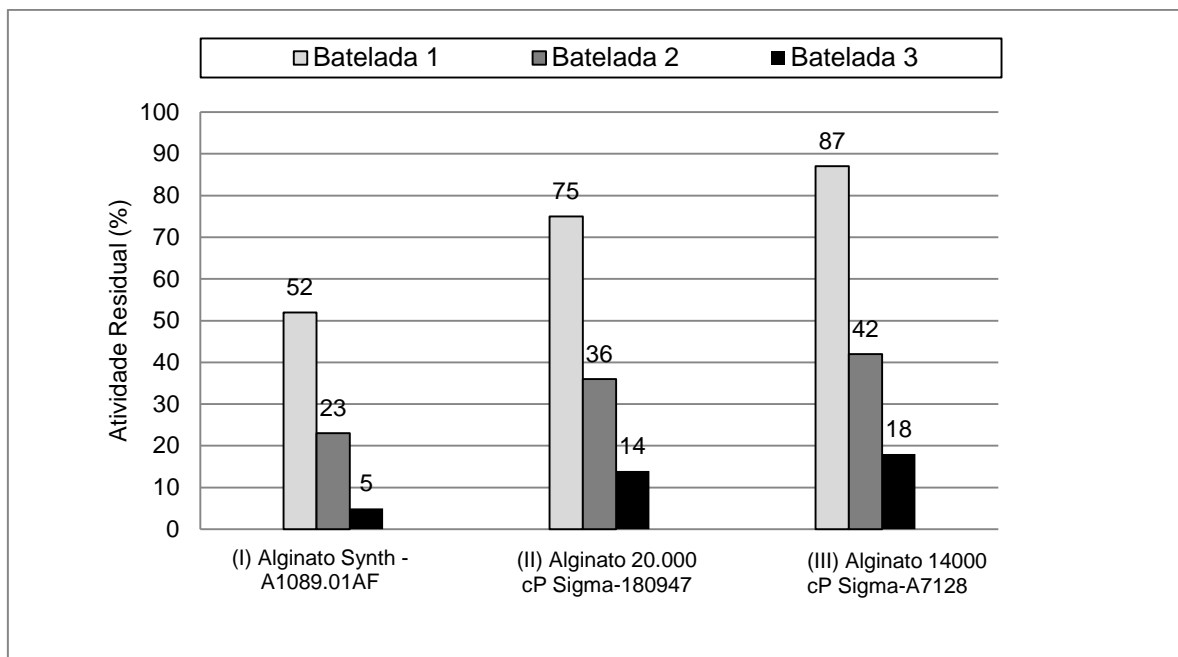


Figura 5. Atividade residual (%) da β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio, durante 3 bateladas de 60 min a 35°C.

Entre os três tipos de alginatos (I, II e III) para a imobilização da β -galactosidase neutra C, com adição de gelatina e a TGase, foi obtido maior atividade β -galactosidase utilizando-se alginato III (Figura 6).

A adição de gelatina e transglutaminase na imobilização da β -galactosidase neutra C resultou em menor atividade enzimática na 1ª batelada (79%) comparada com a β -galactosidase imobilizada somente com alginato de cálcio (87%). No entanto, na 2ª e 3ª batelada utilizando-se alginato de cálcio-gelatina-TGase, foram obtidas maior atividade de β -galactosidase comparada com as amostras de enzima imobilizada somente com alginato de cálcio, nas bateladas correspondentes. Na 3ª batelada utilizando-se a β -galactosidase imobilizada com alginato de cálcio-gelatina-TGase, foi obtida atividade enzimática de 61% enquanto que na 3ª batelada usando a enzima imobilizada somente com alginato de cálcio, foi obtida atividade enzimática de 18%.

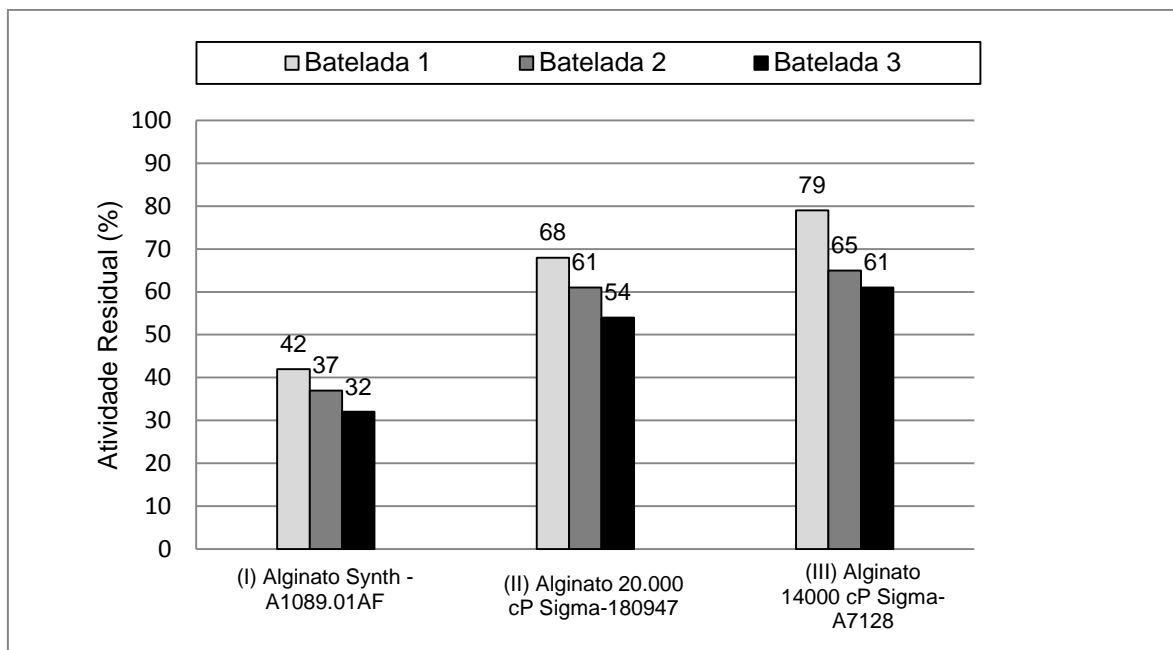


Figura 6. Atividade residual (%) da β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio com gelatina e TGase, durante 3 bateladas de 60 min a 35°C.

Entre os três tipos de alginato de sódio [alginato de sódio I (Alginato Synth-A1089.01AF), II (Alginato 20.000 cP Sigma-180947 [M/G=1,56]), III (Alginato 14000 cP Sigma-A7128 [M/G=1,56])], foi obtido maior atividade enzimática de β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) utilizando-se alginato III (Figura 7).

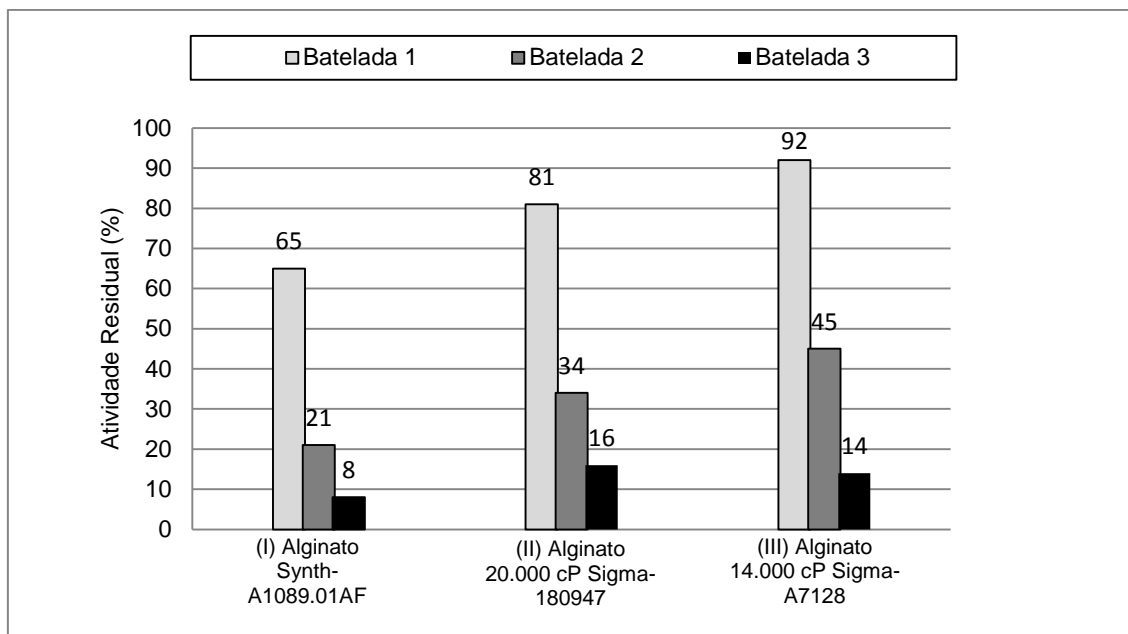


Figura 7. Atividade residual (%) da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) imobilizada em diferentes tipos de alginato, durante 3 bateladas de 60 min a 45°C.

A adição de gelatina e transglutaminase na imobilização da β -galactosidase ácida D em alginato III resultou em menor atividade enzimática na 1ª batelada (84%) comparada com a β -galactosidase imobilizada somente com alginato de cálcio (92%). No entanto, na 2ª e 3ª batelada utilizando-se alginato de cálcio-gelatina-TGase, foram obtidas maior atividade de β -galactosidase comparada com as amostras de enzima imobilizada somente com alginato de cálcio. Na 3ª batelada utilizando-se a β -galactosidase ácida D imobilizada com alginato de cálcio-gelatina-TGase, foi obtida atividade enzimática de 68% enquanto que na 3ª batelada usando a enzima imobilizada somente com alginato de cálcio, foi obtida atividade enzimática de 14% (Figura 8).

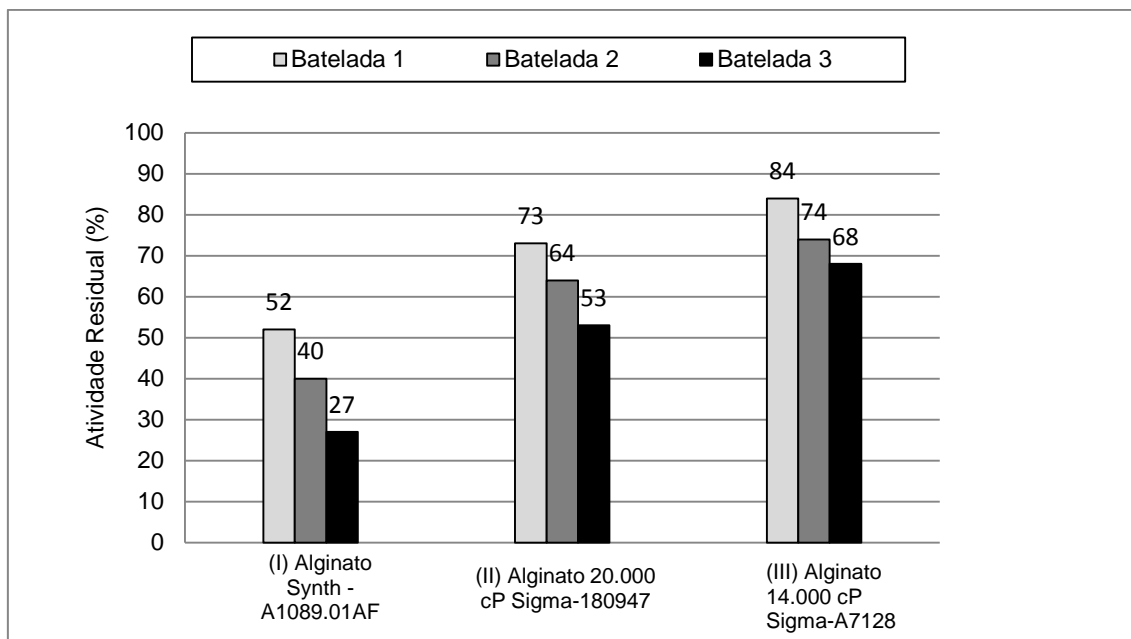


Figura 8. Atividade residual (%) da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) imobilizada em diferentes tipos de alginato de sódio com gelatina e TGase, durante 3 bateladas de 60 min a 45°C.

A maior estabilidade apresentada pelas β -galactosidases neutra C (*S. marxianus var lactis*) e ácida D (*A. oryzae*) imobilizadas em alginato com adição de gelatina e a enzima transglutaminase, é devido a capacidade da TGase formar ligações covalentes cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas, por meio de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e lisina (MACEDO & SATO, 2005) e contribuir para retenção da β -galactosidases na matriz do gel (NONAKA et al., 1989).

MORSCHBACHER et al., (2016) estudaram o efeito do tratamento da β -galactosidase comercial Lactozym[®] 3000L com concanavalina A na imobilização da enzima em alginato de cálcio-gelatina e o efeito da adição de glutaraldeído na preparação dos grânulos da enzima imobilizada. A enzima sem tratamento com concanavalina A e imobilizada em alginato de cálcio com glutaraldeído apresentou 12,36% de conversão da lactose. Utilizando a β -galactosidase imobilizada em alginato de cálcio-gelatina, sem tratamento com concanavalina A e sem adição de glutaraldeído, os autores obtiveram 54% de conversão da lactose de soro de leite.

Usando a β -galactosidase tratada com concanavalina A e sem tratamento com glutaraldeído obtiveram aproximadamente 71,42% de hidrólise da lactose presente no soro de leite, após 360 minutos de reação à 37°C.

Quando glutaraldeído foi usado como agente de formação de ligações cruzadas, a velocidade de conversão de lactose foi menor, possivelmente devido à alta reatividade do glutaraldeído, que favoreceu a formação de ligações entre a enzima e o suporte e que poderia distorcer o centro ativo da enzima levando ao decréscimo ou perda da atividade da enzima (ALONSO et al., 2005; BETANCOUR et al., 2006).

SCHONS (2012) observou na imobilização da enzima tanase de *Paecilomyces variotti* por gelificação iônica em alginato de sódio (3,6%) em solução CaCl_2 (0,1M) reticulada com transglutaminase Activa® e transglutaminase de *Streptomyces sp* que a maior porcentagem de atividade enzimática foi encontrada no ensaio controle (sem adição de agente reticulante). Já para a eficiência de imobilização foi observado resultado contrário, onde o emprego dos reticulantes resultou em aumento significativo para este parâmetro.

SYNOWIECKI & WOLOSOWSKA (2006) utilizaram a enzima transglutaminase como agente de reticulação na imobilização de β -glicosidase de *Sulfolobus shibatae* em sílica gel modificada com 3-aminopropil-trietoxilano. Foi obtido um aumento de 4 vezes na atividade da β -glicosidase após a imobilização com adição da enzima transglutaminase.

No presente estudo as β -galactosidases neutra C e ácida D imobilizadas em alginato I de baixa viscosidade apresentaram valores de atividade enzimática mais baixos indicando baixa estabilidade do alginato enquanto que as β -galactosidases imobilizadas em alginato tipo II e III, de alta viscosidade 20.000 cP e 14.000 cP apresentaram maiores valores de atividade de β -galactosidase. O alginato II, apresentou alta viscosidade, e foi bombeado com dificuldade pela bomba peristáltica para gotejamento na solução de CaCl_2 para formação das esferas de enzima imobilizada, ao contrário o alginato III apresentou maior facilidade de dissolução e melhor escoamento durante o processo de imobilização da enzima.

Para os experimentos seguintes, o alginato tipo III (14000 cP Sigma-A7128 [M/G=1,56]) foi escolhido para a imobilização da β -galactosidase devido a maior retenção da atividade enzimática e por apresentar maior facilidade de manuseio, tanto de preparo do gel como na etapa de imobilização.

4.1.2 Estudo da imobilização das β -galactosidases neutra C e ácida D em álcool polivinílico (PVA) – lentes e esferas de Lentikats® e em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TGase

A Figura 9 apresenta a porcentagem de atividade enzimática das amostras de β -galactosidases neutra C e ácida D imobilizadas em cápsulas de PVA - Lentikats®, lentes PVA - Lentikats® e esferas de alginato de cálcio-gelatina-TGase.

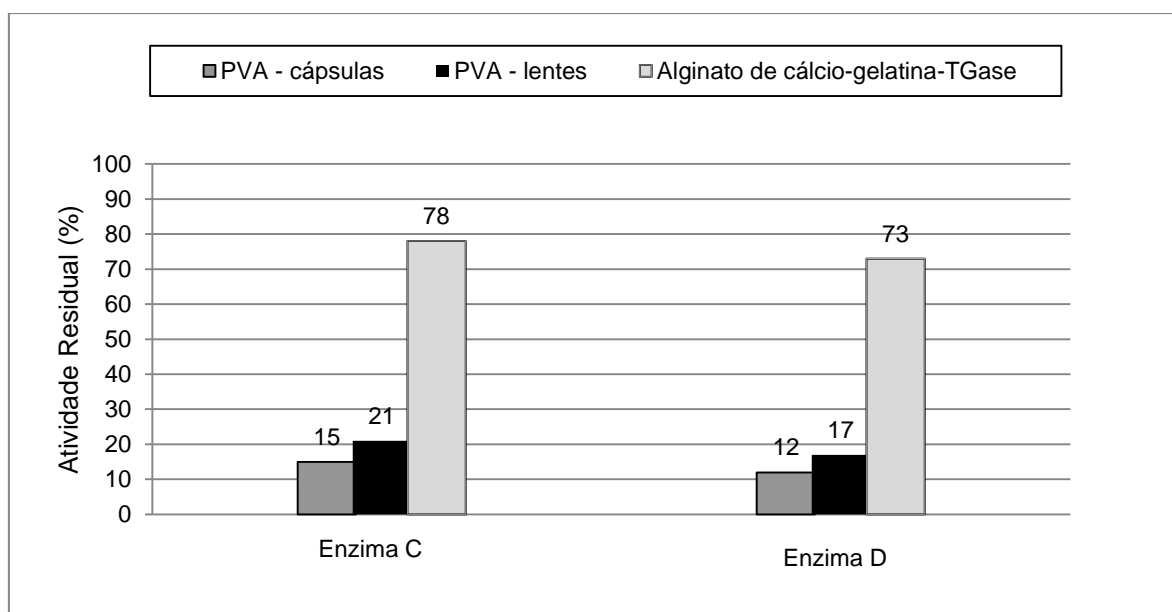


Figura 9. Atividade residual (%) das β -galactosidases neutra C (*S. marxianus var lactis*) e ácida D (*A. oryzae*) imobilizadas em diferentes suportes.

Foi obtida maior atividade das β -galactosidases neutra C (*S. marxianus var lactis*) e ácida D (*A. oryzae*) nas amostras de enzimas imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase (78 e 73%) respectivamente.

A imobilização das β -galactosidases neutra C (*S. marxianus var lactis*) e ácida D (*A. oryzae*) em cápsulas e lentes de PVA - Lentikats[®] resultaram em baixa atividade enzimática. A β -galactosidase neutra C imobilizada em cápsulas e lentes de PVA - Lentikats[®] apresentou atividade relativa de 15 e 21% enquanto que a β -galactosidase ácida D apresentou atividade relativa de 12 e 17%, respectivamente.

GROSOVÁ et al., (2008) descreveram a imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em esferas de álcool-polivinílico (PVA), na forma de lentes e obtiveram 32% da atividade original. A imobilização não alterou o pH ótimo de atividade da enzima (pH 4,5). Foi observado um aumento da atividade relativa da β -galactosidase imobilizada em relação à enzima livre, nos ensaios de inibição pelo produto. Foi verificado que não houve decréscimo da atividade da enzima imobilizada durante 35 bateladas repetidas e durante 530h de hidrólise contínua da lactose. A β -galactosidase imobilizada mostrou-se estável por 14 meses após 14 meses de estocagem 4°C e pH 4,5.

A β -glicosidase de *Aspergillus niger* imobilizada em lentes de PVA - Lentikats[®] apresentou-se mais estável do que a enzima livre, após 3 h de tratamento na faixa de 45 a 55 °C e a imobilização não alterou o pH ótimo de atividade da enzima, permanecendo em 4,5. A taxa de conversão relativa da solução 1,5 mM de celobiose em tampão acetato 0,5 mM pH 5,0 a 50°C, utilizando-se β -glicosidase imobilizada em lentes PVA - Lentikats[®] em coluna de 1,0 cm³ e fluxo de 0,3 mL/min foi de 100% após 5 h entretanto a porcentagem de conversão diminuiu para 40% após 148 h (ANGELOTTI, 2013).

Desta forma neste estudo, o suporte de alginato de cálcio-gelatina-TGase foi escolhido para a imobilização das β -galactosidases neutra e ácida para os testes posteriores.

4.2 Estudo das variáveis na imobilização da β -galactosidase neutra C em alginato de cálcio- gelatina-TGase utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

No planejamento fracionado avaliou-se o efeito das seguintes variáveis, x1 - concentração de alginato de sódio (%), x2 - concentração de cloreto de cálcio (M), x3 – concentração da enzima TGase (%), x4 - concentração de gelatina (%) e x5 – concentração da enzima β -galactosidase C (%). Por meio da análise estatística dos resultados obteve-se os efeitos das variáveis em estudo para a porcentagem de atividade enzimática para 5 bateladas de 1 hora e a média dos valores obtidos. Os dados foram tratados no software Statística[®] 7.0.

A Tabela 4 ilustra os efeitos da % de alginato de sódio, % de TGase, % de gelatina e concentração de CaCl_2 e a Tabela 5 a eficiência de imobilização da β -galactosidase estimada pela porcentagem de atividade de β -galactosidase durante 5 bateladas nos 19 ensaios estudados. Os valores de atividade enzimática foram calculados considerando-se a atividade enzimática da β -galactosidase livre como 100%. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos no ensaio 16 (52,5%) onde todas as variáveis independentes estavam no seu nível mais alto (+1). Resultados muito próximos ao ensaio 16 foram encontrados nos 3 ensaios do ponto central (0) (2% de alginato de sódio, 0,2M de CaCl_2 , 0,5% de TGase, 0,5% de gelatina e 20% de β -galactosidase) com os valores de hidrólise de 51,8, 51,8 e 52,1% respectivamente. Os resultados apresentados no ponto central indicam que a adição de gelatina e transglutaminase na imobilização da β -galactosidase em alginato de cálcio aumentou a atividade enzimática da enzima.

A menor % de atividade de β -galactosidase foi obtida no ensaio 3 (27%) utilizando-se 1% de alginato de cálcio, 0,3M de CaCl_2 , 0% de TGase, 0% de gelatina e 10% de β -galactosidase.

Tabela 4. Porcentagem de atividade da β -galactosidase durante 5 bateladas de 1h e média dos valores obtidos nos 19 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , TGase, gelatina e β -galactosidase neutra C (*S. marxianus var lactis*).

ENSAIOS	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4	Batelada 5	MÉDIA
	Atividade Enzimática (%)					
1	62,4	58,2	49,2	35,6	20,7	45,2
2	60,8	59,1	43,3	34,5	18,6	43,2
3	62,4	43,5	18,2	9,0	2,1	27,0
4	62,1	55,2	41,0	38,1	34,2	46,1
5	61,2	43,2	21,3	12,5	2,9	28,2
6	60,4	40,1	26,8	15,3	3,9	29,3
7	61,5	41,3	24,8	16,3	4,4	29,7
8	61,5	39,2	24,1	13,8	5,2	28,8
9	62,1	54,9	43,8	31,1	10,8	40,5
10	61,8	55,4	44,7	34,9	14,5	42,3
11	61,7	54,6	48,2	39,1	11,7	43,1
12	60,8	53,7	35,1	24,7	5,9	36,0
13	60,8	54,1	42,5	37,1	18,2	42,5
14	61,8	56,2	46,2	32,7	25,1	44,4
15	60,2	45,0	37,3	24,1	11,8	35,7
16	62,8	59,3	54,8	48,2	37,3	52,5
17	62,5	57,6	53,6	49,2	36,1	51,8
18	62,3	58,1	54,2	49,9	34,2	51,8
19	61,4	57,23	56,4	48,3	37,2	52,1

Tabela 5. Porcentagem da eficiência de imobilização da β -galactosidase neutra C (*S. marxianus* var *lactis*) obtidos nos 19 ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para estudo do efeito da concentração de alginato de sódio, CaCl_2 , TGase, gelatina e β -galactosidase

Ensaio	Eficiência de Imobilização (%)
1	63
2	72
3	32
4	62
5	40
6	52
7	58
8	72
9	57
10	61
11	59
12	74
13	68
14	77
15	75
16	81
17	73
18	78
19	72

Tabela 6. Resultados dos efeitos e p-valor do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} na atividade de β -galactosidase estudada em 5 bateladas de 1 hora individualmente

	Batelada 1		Batelada 2		Batelada 3		Batelada 4		Batelada 5	
Nome	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
X1 (Alginato de Sódio)	-0,04	0,9274	33	0,2625	3,84	0,3367	4,67	0,2641	7,76	0,1428
X2 (CaCl₂)	0,21	0,6075	-3,68	0,1689	-4,29	0,2854	-2,55	0,5348	-0,26	0,9586
X3 (TGase)	-0,49	0,2496	-7,02	0,0161	-5,71	0,1621	-5,87	0,1667	-1,21	0,8106
X4 (Gelatina)	-0,04	0,9274	6,67	0,0208	139	0,0054	12,1	0,0104	5,41	0,2956
X5 (β-galactosidase)	0,34	0,4186	33	0,2665	7,84	0,0635	10,28	0,0243	7,81	0,1405

nível de significância: alfa=10%

Neste estudo, observou-se uma melhor formação das esferas de alginato de sódio quanto utilizado 2% de alginato em solução e para as 5 bateladas estudadas, o efeito da quantidade de alginato de sódio não apresentou efeito significativo e optou-se em utilizar o valor do ponto central (2%) para as imobilizações posteriores.

O parâmetro gelatina variou entre 0% e 1%. Foi observado efeito significativo desta variável para as bateladas 2, 3 e 4 e para as imobilizações sequentes fixou-se o valor em 1%. A variável β -galactosidase foi fixada no nível superior (+1) correspondendo a 30% (v/v). Para as variáveis concentração de cloreto de cálcio e TGase, os resultados encontrados não apresentaram efeitos significativos em nenhuma das bateladas estudadas. Optou-se em fixar os valores para concentração de CaCl₂ e TGase no ponto central, sendo 0,2M e 0,5% respectivamente, devido a estas variáveis serem consideradas importantes na estabilidade das esferas de alginato.

CARVALHO (2013), estudou a imobilização de células de *Serratia phymuthica* ATCC 15928 em esferas de alginato de cálcio com adição de TGase e obteve maior estabilidade de conversão de sacarose em isomaltulose quando comparada com células imobilizadas somente com alginato de cálcio.

4.3 Caracterização das β -galactosidases neutras (A, B, C) e ácida (D) nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

4.3.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras e ácidas, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

4.3.1.1 Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

As β -galactosidases neutras A e B obtidas de *K. lactis*, nas formas livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentaram temperatura ótima de 35°C em pH 7,0 (Figura 10) sendo estes resultados similares ao encontrado por ESCOBAR et al., (2014), onde o autor estudou a imobilização da enzima β -galactosidase de *K. lactis* em alginato de cálcio 0,8% e solução de cloreto de cálcio 0,3% e os resultados demonstraram que as condições ideais para atividade da enzima não foram alteradas com a imobilização, sendo a temperatura ótima encontrada para enzima livre e imobilizada de 35°C em pH 7,0.

A β -galactosidase neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis* nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou temperatura ótima de 40°C em pH 7,0 (Figura 10).

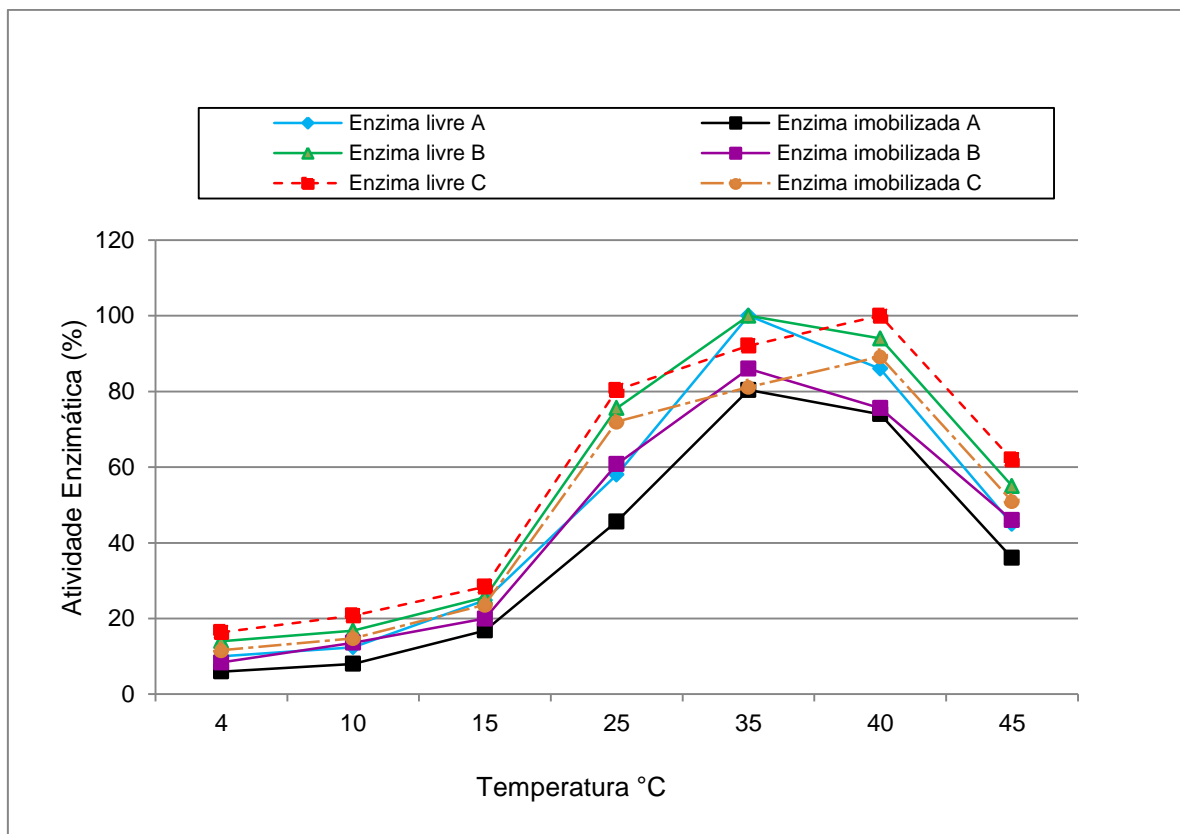


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade das β -galactosidases A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus var lactis*) neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

Segundo ALVES (2008), a temperatura ótima para a β -galactosidase bruta de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7028 imobilizada em alginato de cálcio aumentou para 40°C em comparação com a enzima livre (37°C).

JOCHEMS et al. (2011) relataram que a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* na forma livre e imobilizada pelo método de adsorção em matriz mista de dióxido de zircônio apresentou temperatura ótima de atividade à 30°C.

CABUK et al. (2014), imobilizaram a β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em matriz de quitosana –hidroxiapatita e não encontraram alteração na temperatura ótima de 37°C da enzima livre quando comparada com a sua forma imobilizada. Porém, entre 40 e 50°C, a enzima imobilizada apresentou 87,2% a 55,6% de

atividade relativa, enquanto a enzima livre apresentou uma redução significativa de 61,2% a 30,3%.

VIEIRA (2009) estudou o efeito da temperatura sobre a atividade da β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído, e observou que a imobilização não alterou o valor da temperatura máxima (45°C) de atividade da enzima.

4.3.1.2 Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*), nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

A β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*), na forma livre apresentou temperatura ótima de atividade de 50°C (Figura 11). A β -galactosidase ácida D imobilizada apresentou atividade a 45°C sendo que acima da temperatura de 50°C foi observado alteração da textura dos grânulos de alginato de cálcio-gelatina-TGase e diminuição da atividade enzimática.

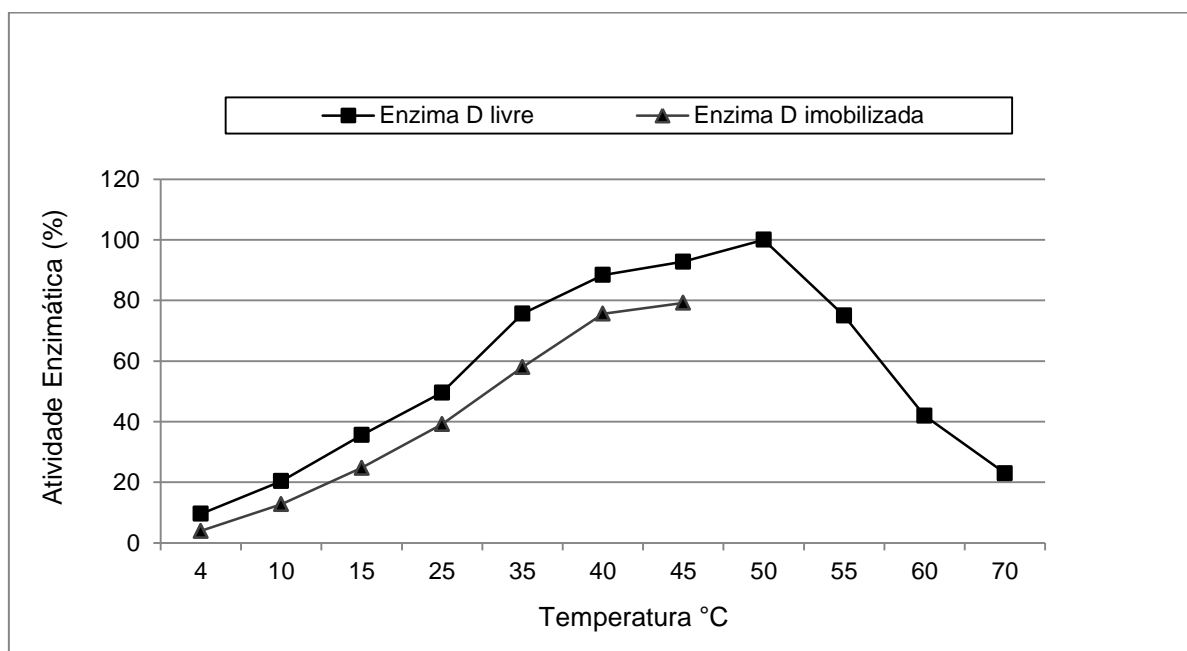


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase D ácida (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

No aquecimento de soluções de alginato de sódio pode ocorrer despolimerização térmica, sendo a quantidade de despolimerização dependente do tempo, temperatura e do pH. Quanto menor o pH, mais rápida a degradação a elevadas temperaturas (SANTOS, 2012).

ELNASHAR et al. (2014), em estudo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em esferas de K-carragena, observaram temperatura ótima de atividade mais alta para enzima imobilizada (45-55°C) em comparação a enzima livre (45-50°C) e sugeriram que a imobilização aumentou a estabilidade da enzima.

HAIDER & HUSAIN (2007) observaram que não houve alteração da temperatura ótima de atividade (55°C) da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de cálcio e com ligações cruzadas com concanavalina (Con A-B) comparada com a enzima livre. Porém, para temperaturas na faixa de 55 à 80°C houve maior retenção da atividade da enzima imobilizada com relação a enzima livre, demonstrando uma maior estabilidade das enzimas imobilizadas.

4.3.2 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras e ácidas nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

4.3.2.1 Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

As Figuras 12a, 12b e 12c ilustram respectivamente a estabilidade térmica das β -galactosidases neutras A, B e C nas formas livres e imobilizadas. Na temperatura de 35°C, as enzimas A e B livres apresentaram estabilidade similar com retenção da atividade enzimática, após 360 minutos em pH 7,0, de aproximadamente 86,8 e 89,2% para enzima livre e 72,8 e 76,8% para enzima imobilizada respectivamente. A enzima C livre e imobilizada apresentou maior retenção de atividade enzimática na temperatura de 35°C com 92,4% para enzima livre e 77,6% para sua forma imobilizada, após 360 minutos em pH 7,0.

As β -galactosidases neutras A e B obtidas de *K. lactis*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentaram baixa estabilidade térmica a 45°C e retiveram cerca de 12 a 26,4% de atividade inicial após 360 minutos (Figuras 12a e 12b). Enquanto que a β -galactosidase neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase retiveram cerca de 42 a 35% de atividade inicial após 360 minutos a 45°C (Figura 12c).

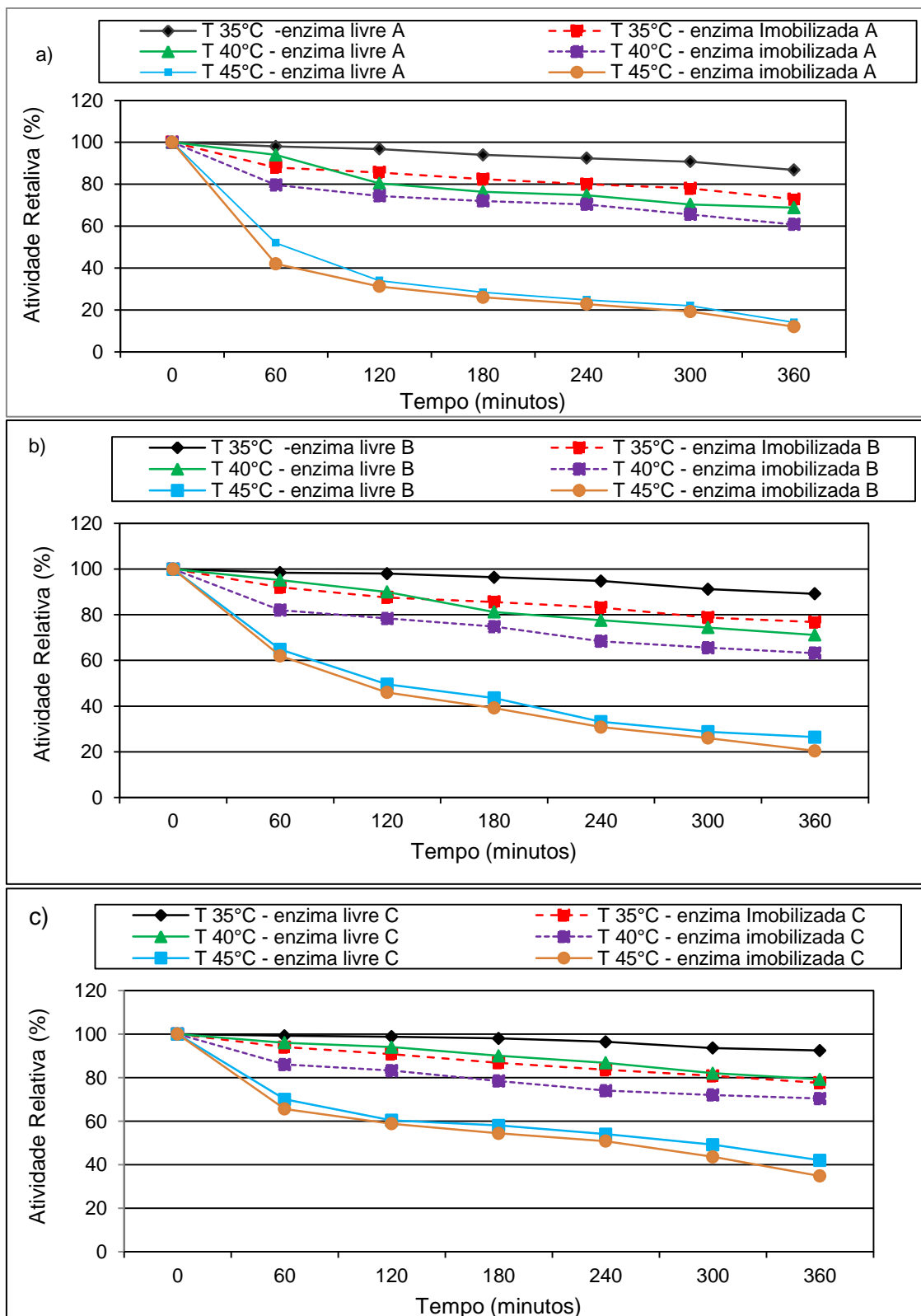


Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade das β -galactosidasas neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase: a) Enzima A (β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*); b) Enzima B (β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*); c) Enzima C (β -galactosidase de *Saccharomyces marxianus* var *lactis*).

VIEIRA (2009) estudou a imobilização de β -galactosidase comercial Lactozym 3000L obtida de *K. fragilis* em diferentes suportes. A enzima imobilizada em quitosana-glutaraldeído perdeu apenas 20% da atividade inicial após 90 dias incubada em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 com íons bivalentes Mn^{2+} e Mg^{2+} a 10°C e foi 3-5 vezes mais estável que a enzima solúvel nas temperaturas de 20 e 40°C em pH 7,0. A estabilidade operacional (40°C e pH7,0) realizada em 4 ciclos mostrou uma perda de 17% da atividade hidrolítica inicial ao final do quarto ciclo.

4.3.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

A enzima ácida D obtida de *A. oryzae*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase reteve atividade enzimática de 82,8 e 77%, respectivamente, após 360 minutos a 45°C (Figura 13).

FREITAS (2007) estudou a estabilidade térmica de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre, e obteve para a temperatura de 53°C uma queda de 31,1% da atividade após 275 minutos de incubação. Já para a temperatura de 65°C ocorreu uma rápida desnaturação da enzima, sendo necessários apenas 5 minutos para que a enzima perdesse 80% de sua atividade catalítica.

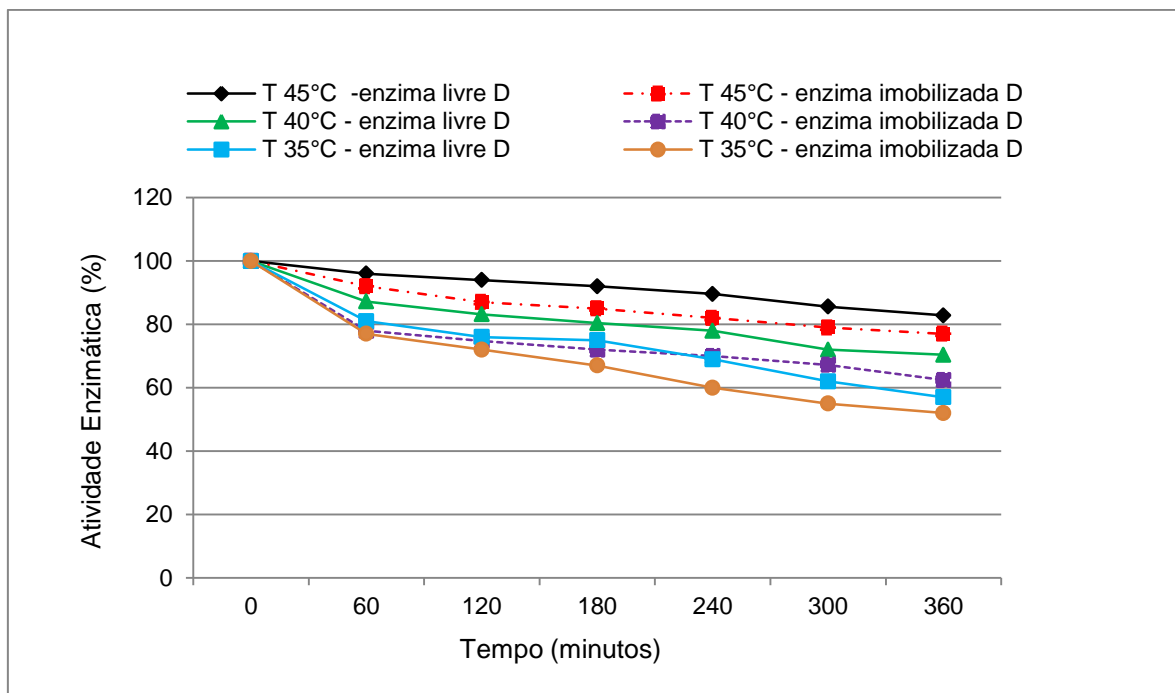


Figura 13. Efeito da temperatura na estabilidade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina e TGase.

A imobilização das β -galactosidases A, B, C e D em alginato de cálcio-gelatina-TGase, nas condições estudadas neste trabalho, não aumentou a estabilidade térmica das enzimas.

4.3.3 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras e ácidas nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

4.3.3.1 Efeito do pH na atividade das enzimas β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

As β -galactosidases neutras A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus* var. *lactis*) na forma livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase

apresentaram atividade ótima na faixa de pH 6,5 a 7,0 e baixa atividade em pH 5,5 e acima de 7,5 em temperatura de 35°C (Figura 14).

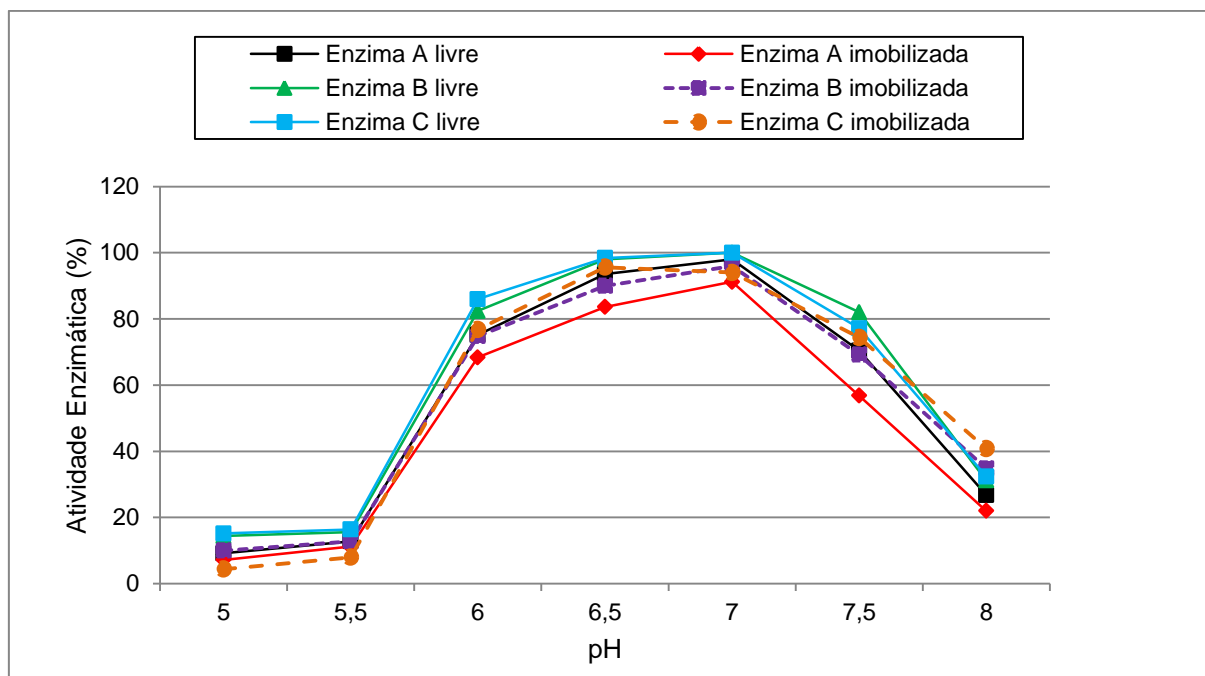


Figura 14. Efeito do pH na atividade das β -galactosidases A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus* var *lactis*) neutras nas formas livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

As enzimas comumente utilizadas para hidrólise da lactose são extraídas das leveduras *Kluyveromyces lactis*, que apresentam pH ótimo entre 6 e 7, e temperatura ótima de 35°C ou *Kluyveromyces fragilis*, com pH ótimo em torno de 6,5 e temperatura ótima de 40°C (ZADOM, 1984). Como observado na Figura 14 e citado pela literatura acima, os resultados encontrados neste trabalho são próximos as condições de pH e temperatura das enzimas comumente utilizadas na hidrólise da lactose.

A β -galactosidase comercial, Lactozym® da Novozymes obtida de *Kluyveromyces lactis*, nas formas livre e imobilizada em Eupergit® apresentou atividade ótima em pH 6,6 (CAMPELLO, 2010).

LADERO et al., (2000) estudaram a imobilização da β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em sílica-alumina e verificaram também que a imobilização não alterou o pH ótimo da enzima. No entanto, no trabalho de ZHOU & CHEN (2001), a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em grafite resultou em mudança no pH ótimo para um valor mais alcalino (7,7), comparado com a enzima livre (6,6).

MANERA et al., (2008) caracterizaram a β -galactosidase obtida da permeabilização de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e obtiveram a atividade máxima em pH 6,6 e temperatura de 50°C.

4.3.3.2 Efeito do pH na atividade da enzima β -galactosidase ácida, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

A β -galactosidase ácida D obtida de *A. oryzae*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou atividade ótima em pH 4,5 e baixa atividade em pH 7,0 (Figura 15).

Preparações enzimáticas de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, solúveis e imobilizadas em A-celite 545 exibiram o mesmo perfil de pH e temperatura ótimo de atividade em pH 4,5 e 50°C, respectivamente. A enzima imobilizada reteve 78% e 39% da atividade original em pH 3,0 e pH 8,0, ao passo que a enzima livre nas mesmas condições experimentais mostrou atividade residual de 41% e 14%, respectivamente. A β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre nas temperaturas de 40°C e 70°C apresentou atividade relativa de 58 e 35%, respectivamente, e foi observado um aumento significativo da atividade da enzima imobilizada. A 40°C a enzima imobilizada apresentou atividade de 91% e em 70°C atividade de 72% (ANSARI & HUSAIN, 2012). Posteriormente ANSARI et al (2014) relataram que a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* na forma livre e imobilizada em membrana de acetato de celulose apresentou atividade ótima em pH 4,5 e a 50°C.

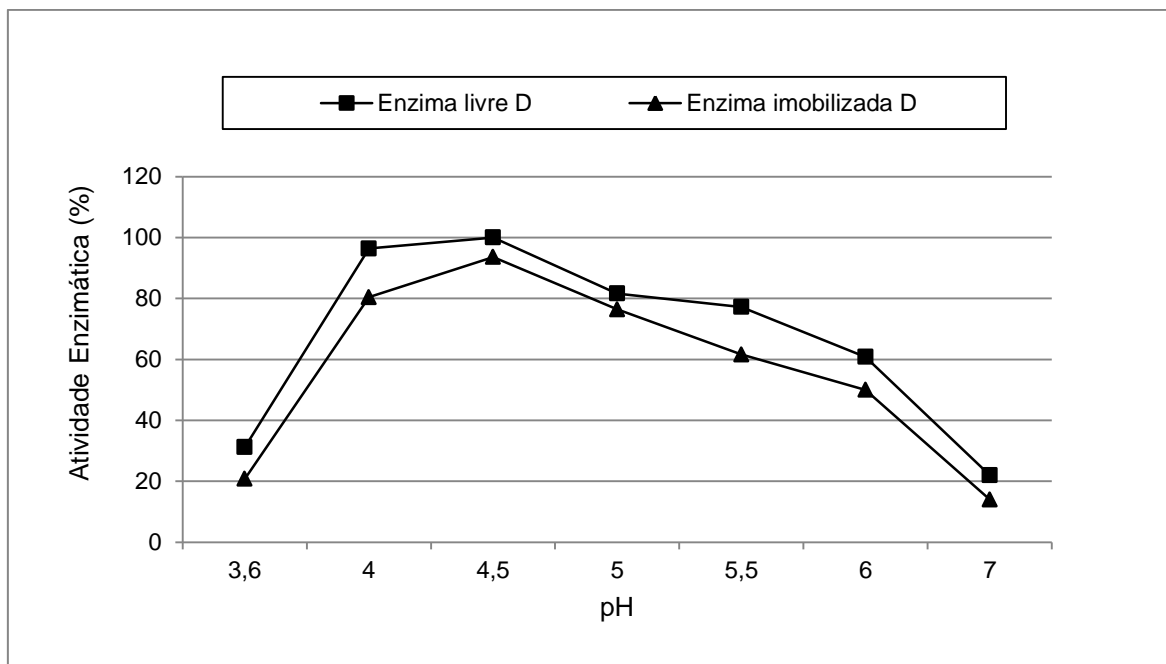


Figura 15. Efeito do pH na atividade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*) na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

4.3.3.3 Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase

As β -galactosidases neutras A (*K. lactis*), B (*K. lactis*) e C (*S. marxianus* var. *lactis*) nas formas livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentaram maior estabilidade em pH 7,0 do que em pH 6,5 e 7,5 (Figura 16).

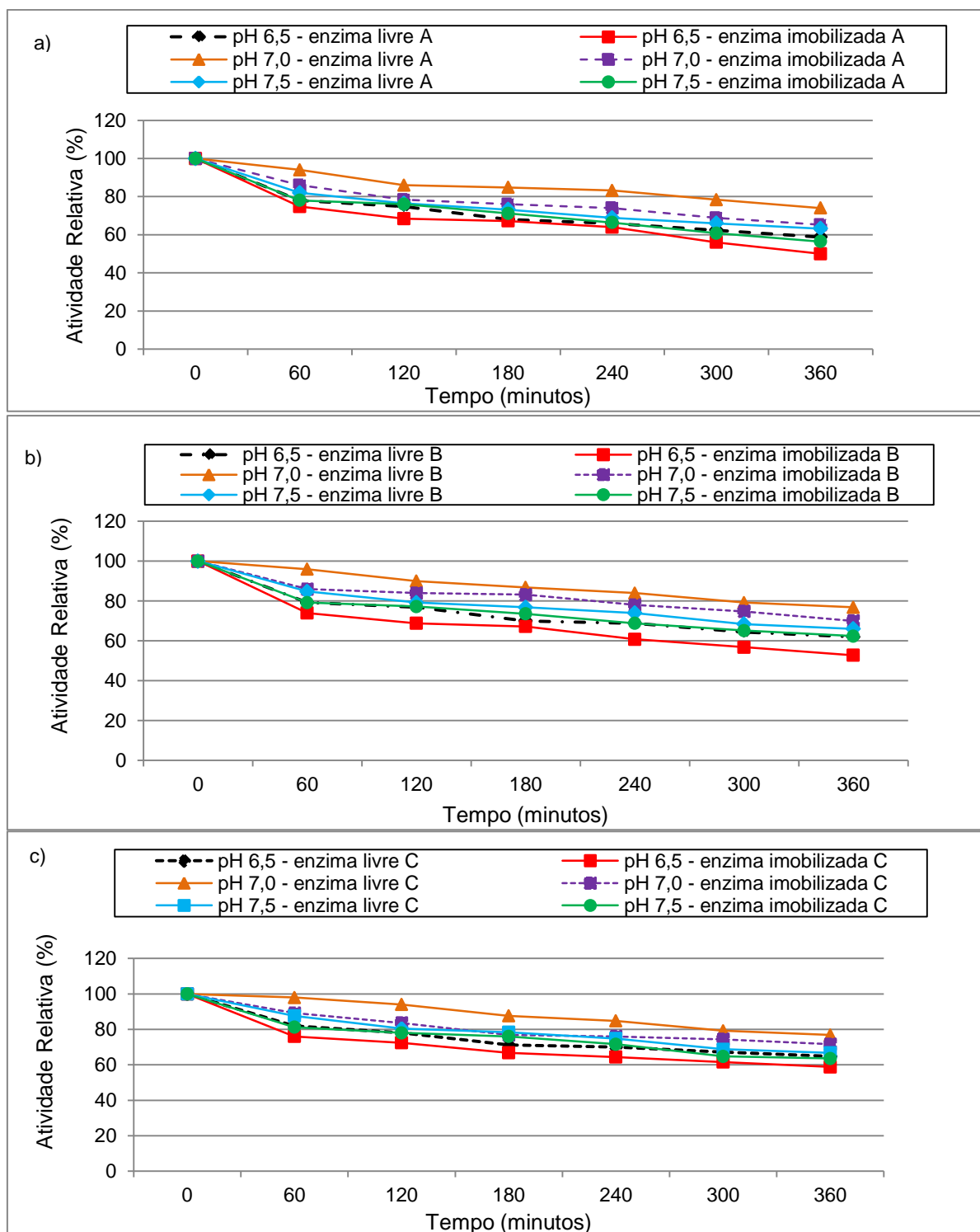


Figura 16. Efeito do pH na estabilidade das β -galactosidases neutras livres e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase: a) Enzima A (β -galactosidase de *K. lactis*); b) Enzima B (β -galactosidase de *K. lactis*); c) Enzima C (β -galactosidase de *S. marxianus* var *lactis*).

Após 360 minutos as β -galactosidases A, B e C imobilizadas permaneceram com 65, 70 e 71% de atividade enzimática residual, respectivamente, indicando boa estabilidade em pH 7,0.

4.3.3.4 Estudo do efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase

A β -galactosidase ácida D obtida de *A. oryzae*, nas formas livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou maior estabilidade em pH 4,5, comparada com pH 4,0 e 5,0 após 360 minutos à 45°C (Figura 17). Em pH 4,5 a atividade residual da β -galactosidase ácida D na forma livre e imobilizada foi 78,5% e 74,8%, respectivamente, após 360 minutos à 45°C.

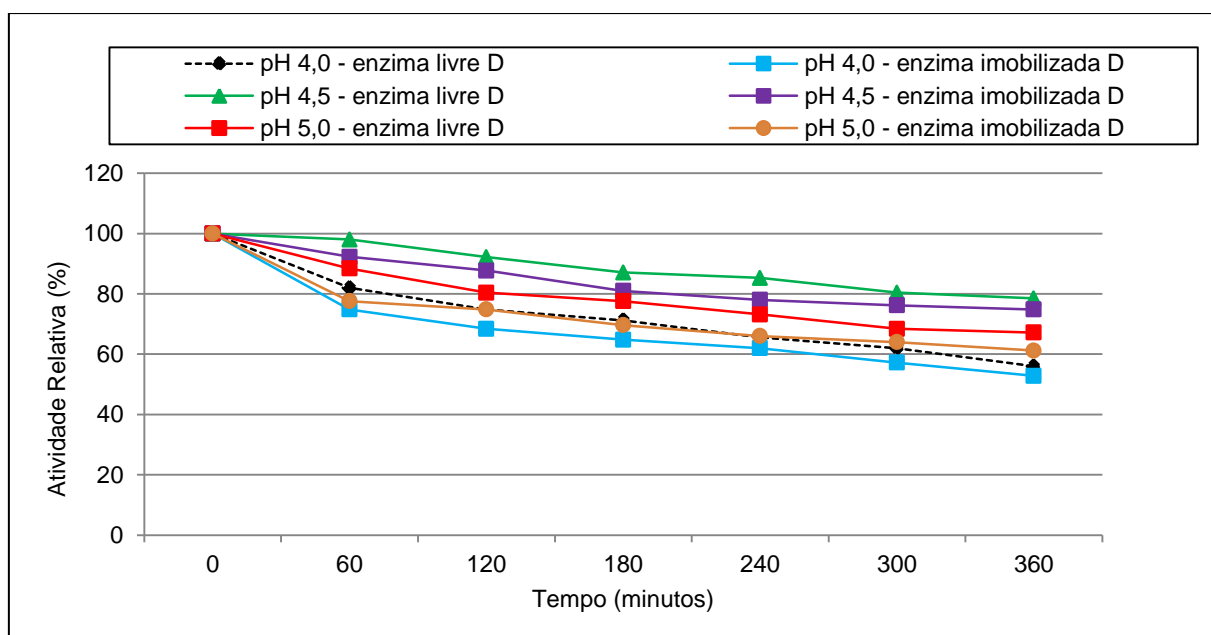


Figura 17. Efeito do pH na estabilidade da β -galactosidase ácida D (*A. oryzae*), na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

4.4 Estudo da reutilização das β -galactosidases neutra C e ácida D imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase em sistema de batelada

No estudo da reutilização a β -galactosidase neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis*, imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 76% de atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 35°C. A atividade de β -galactosidase neutra C diminuiu para 42% e 12% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente (Figura 18).

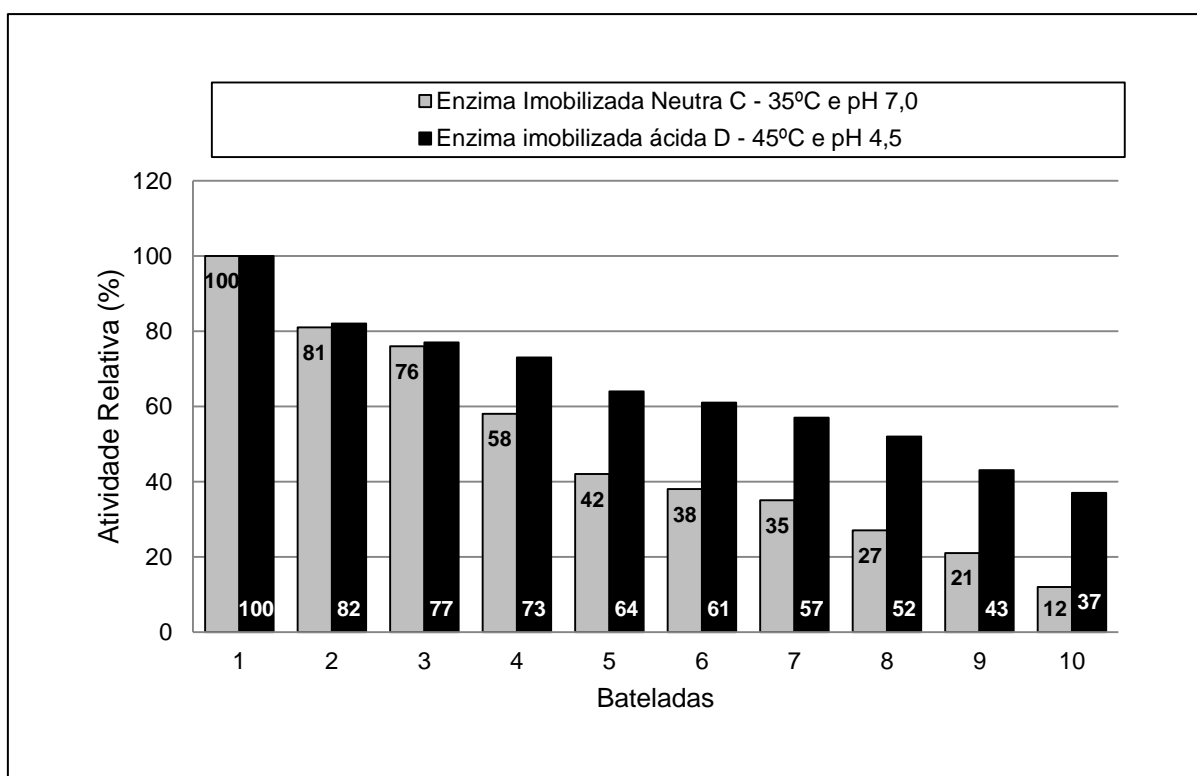


Figura 18. Estudo da reutilização da β -galactosidase neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis* e da β -galactosidase ácida D obtida de *Aspergillus oryzae* imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase.

A β -galactosidase ácida D obtida de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 77% de atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 45°C e a atividade diminuiu para 62% e 37% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente (Figura 18).

FREITAS (2013) avaliou a estabilidade operacional da β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* imobilizada em quitosana e reticulada com glutaraldeído 0,8% na hidrólise da lactose, em solução 5%, após 10 ciclos de bateladas consecutivas a 40°C e pH 7,0. A conversão da lactose foi de aproximadamente de 53% para todos os ciclos.

ROY & GUPTA (2003) imobilizaram a β -galactosidase comercial Lactozym TM de *Kluyveromyces fragilis*, em esferas de celulose com epícloridrina. A enzima hidrolisou a lactose do soro de leite (>90%) em leite fluidizado após 5 horas de incubação. A enzima imobilizada pode ser reutilizada por 3 vezes sem mudança na performance do reator de leite fluidizado. Cerca de 60% da lactose do leite pode ser hidrolisada pela enzima imobilizada em leite fluidizado após 5 horas.

HAIDER & HUSAIN (2007) imobilizaram a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de cálcio e concanavalina A e obtiveram 89% de hidrólise de lactose em soro de leite e 79% de hidrólise de lactose em leite, após 3 e 4 horas de reação, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Foi obtido maior atividade de β -galactosidase utilizando-se o alginato de sódio III (14000 cP Sigma-A7128) para a imobilização das β -galactosidases comerciais neutra C obtida de *S. marxianus* var. *lactis* e ácida D obtida de *A. oryzae*. A utilização do alginato de sódio III, apresentou vantagens como maior facilidade de dissolução e melhor fluidez no bombeamento e gotejamento da solução com obtenção de esferas mais homogêneas em relação aos alginatos I e II.

A adição de gelatina e transglutaminase para a imobilização das β -galactosidases neutra C e ácida D em alginato de cálcio aumentou a atividade da enzima na 2ª e 3ª batelada, comparada com a enzima imobilizada somente com alginato de cálcio, nas bateladas correspondentes.

A β -galactosidase neutra C e ácida D imobilizadas em cápsulas e lentes de PVA - Lentikats® apresentaram baixa atividade enzimática. A β -galactosidase neutra C imobilizada em cápsulas e lentes de PVA - Lentikats® apresentou atividade relativa de 15 e 21% enquanto que a β -galactosidase ácida D apresentou atividade relativa de 12 e 17%, respectivamente, indicando que o suporte apresentou limitações difusionais.

As β -galactosidases A e B neutras, obtidas de *Kluyveromyces lactis*, nas formas livre e imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase, apresentaram temperatura ótima de atividade a 35°C em pH 7,0 enquanto que a β -galactosidase C, obtida de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou temperatura ótima de atividade a 40°C em pH 7,0.

As características bioquímicas pH e temperatura ótima de atividade das β – galactosidases A, B e C imobilizadas em matriz de alginato de cálcio-gelatina-TGase, não foram alteradas quando comparadas com suas formas livres o que indica que a imobilização não alterou a estrutura da enzima.

A β -galactosidase neutra C obtida de *Saccharomyces marxianus* var. *lactis*, imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 75,6% de

atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 35°C, sendo que a atividade diminuiu para 42% e 12% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente.

A β -galactosidase ácida D obtida de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em alginato de cálcio-gelatina-TGase apresentou cerca de 77% de atividade enzimática após 3 bateladas de 6 horas a 45°C e a atividade diminuiu para 62% e 37% na 5ª e 10ª bateladas, respectivamente.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicação das β -galactosidase C e D imobilizadas em alginato de cálcio-gelatina-TGase em leite e soro de leite e estudo da vida útil em reator contínuo, em diferentes temperaturas.
- Estudo de diferentes matrizes para a imobilização para as β -galactosidases comerciais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A.F.; OSMAN, M.Y.; ABDEL-NABY, M.A. – Production and immobilization of cellobiase of *Aspergillus niger* 20, **Chemical Engineering Journal**, v.68, p. 189-196, 1997.

ADHIKARI, K., DOOLEY, L. M., CHAMBERS, E., BHUMIRATANA, N. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n.1, p.113–118, 2010.

ALONSO, N., LOPEZ-GALLEGO, F.; GUISAN, L.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads support by glutaraldehyde crosslinking method. **J. Mol. Cat B-Enzym** v.35, p.57-61, 2005.

ALVES, F.G. Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7028 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada. Rio Grande, 2008. 96 f. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande.

ANGELOTTI, J.A.F. Estudo da produção, imobilização e aplicação da β -glicosidase de *Aspergillus* sp. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, 2013.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 136, de 08 de fevereiro de 2017. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis>

ANSARI, S.A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p.351–359, 2012.

ANSARI, S.A.; SATAR, R.; ZAIDI, S.K.; AHMAD, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on cellulose acetate-polymethylmethacrylate membrane and its application in hydrolysis of lactose from milk and whey. **International Scholarly Research**, v.2014, p – 6, 2014.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones; **Ars Pharmaceutica**, v.39, p.23-29, 1998.

BECERRA, M.; PRADO, S.D.; SISO, M.I.; Cerdán, M. E. New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase. **Protein Eng**, v.14(5), p. 379-86, 2001.

BALDASSO, C., BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey protein by ultrafiltration. **Desalinization**. V.278, 381- 386, 2011.

BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIERBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th revised and extended ed.; Springer - Verlag: Berlin Heidelberg, 2009.

BETANCOUR, L. LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAOMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Different mechanism of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effects of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microb. Tech.** v. 39, p. 877-882, 2006.

BODALO, A., GOMEZ, J. L., GOMEZ, E., MAXIMO, M. F., HIDALGO, A. M. Simulation of transient state in enzymatic membrane reactors for resolution of DL-valine and experimental. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v. 9, p. 978–984, 2001.

BON, E P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2008.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. 2 ed. São Paulo: Blucher, 2001. v. 1. S.n.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, V.L.; MIEZELIENE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v.3, n.1, p.95-105, 2005.

BULHÕES, A.C.; GOLDANI, H.A.S.; OLIVEIRA, F.S.; MATTE, U.S.; MAZZUCA, R.B.; SILVEIRA, T.R. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A 22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult type

hypolactasia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, pg. 1441 – 1446, 2007.

CABUK,B.; TARI, C.; HARSA, S.T. β -galactosidase immobilization on chitosan – hydroxyapatite complex: effects of immobilization conditions. Department of Food Engineering, Izmir Institute of Technology, USA, v.1, 2014.

CAMMAROTA, M.C.;FREIRE,D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content.**Bioresource Technology**,n. 97, p. 2195-2210,February/April, 2006.

CAMPELLO, G.S. **Imobilização de β – galactosidase (Lactozym®) em Eupergit® C e sua caracterização**. 2010. 81 p. Dissertação Mestrado – Universidade do Rio Grande do Sul – Escola de Química e Alimentos. Rio Grande, RS, 2010.

CAPRIO, C.; GONZALEZ, P.; RUALES, J.; BATISTA-VIEIRA, E. Bone bound enzymes for food industry applications. **Food Chem**, v.68, p. 525-529, 2000.

CAO, L. Immobilized enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v.9, p.227 – 226, 2005.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces lactis*. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CARVALHO, P.H. Conversão de sacarose em isomaltulose e trealulose utilizando – se células imobilizadas de *Serratia phymuthica* ATCC 15928 livres e imobilizadas em diferentes matrizes com adição de transglutaminase. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia e Alimentos – UNICAMP, 157 p, 2013.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**.v.445-446, p. 385-396, 2013.

CASTRO, L.B.R. Imobilização de proteínas sobre superfícies de polissacarídeos. Tese de doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CAVAILLE, D.; COMBES, D. Characterization of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.22, p.55-64, 1995.

CHAMPLUVIER, B.; KAMP, B.; ROUXHET, P.G. Immobilization of β - galactosidase retained in yeast: adhesion of the cells on a support. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, no. 5-6, pp. 464 – 469, 1988.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p.259-262, 2002.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese de doutorado - Ciência de Alimentos – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CORGNEAU, M.; SCHER, J.; RITIE-PERTUSA, L.; LE, D.T.L.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; BANON, S.; GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: tolerance thresholds and currently available answers. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v.15, p.3344-3356, 2017.

CUNHA, L.R.; SOARES, N.F.F.; ASSIS, F.C.C.; MELO, N.R.; PEREIRA, A.F.; SILVA, C.B. Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 23-26, 2007.

DANTAS, A. Imobilização e caracterização da lipase NS-40116 em poliestireno. Dissertação de mestrado – Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MOARES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização In: (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia:**

Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p.123-150.

DRAGOSITS, M.; PFLUEGL, S.; KURZ, S.; RAZZAZI-FAZEELI, E. WILSON, I.B.; RENDIC, D. Recombinant *Aspergillus* beta-galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p. 3553-3567, 2014.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v.100, p.1983 – 1991, 2009.

DUMITRIU, E. CHORNET, E. Inclusion and release of protein from polysaccharide-based polyion complexes. **Adv. Drug Deliv.** v. 31, p. 223-246, 1998.

EGGERS, D.K.; VALENTINE, J.S. Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability, **Protein Sci.** v.10, p. 250- 261, 2001.

EL-HADI, A.A. Factors affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumilus*E601 cells in poly(vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. **Process Biochem**, v.38, p.1659–1664, p.2003.

ELNASHAR, M.M.; AWAD, G.E.; HASSAN, M.E.;ELDIN, M.S.M.; HAROUN, B.M.; EL-DIWANY, A. Optimal immobilization of β -galactosidase onto κ -carrageenan gel beads using response surface methodology and its applications. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, ID 571682, p. 7, 2014.

ESCOBAR, G.P.; SOUZA, C.F.V.; NEUTZLING, D. Avaliação de β -galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v.11, n.1, p. 117-129, 2014.

ESTESVAG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85-91, 1998.

FAEDO, R.; BRIÃO, V.B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI, A. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processo de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. **Revista CIATEC – UPF**, v. 3, p. 44-54, 2013.

FALLEIROS, L.N.S.S. Imobilização e estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em Duolite A568. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

FERNANDES, P.; MARQUES, M.P.C; CARVALHO, F.; CABRAL, J.M.S – A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. **J Chem Technol Biotechnol**; v. 84:p. 561–564, 2009.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z. GUIÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme Microb Technol**, v.41, p.565-569, 2007.

FERRER, M.; MARTINEZ- MARTINEZ, M.; BARGIELA,R.; STREIT,W.R.; GOLSYSHINA O.V.; GOLYSHIN, P.N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metanogenomics: current status and futures trends. **Microb. Biotechnol**;; v.9.; p. 22-34, 2016.

FISCHER, J. Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia; 2010.

FOX, P.E.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENY, P.L.H.; O'MAHONY,J.A. Lactose. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**, pg. 21-68. Ed.Springer International Publish, Cham, 2015.

FRAMPTON, M. B.; ZELISKO, P. M. Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing esters and alcohols by immobilized Candida antarctica lipase B. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58-59, p. 87-92, 2014.

FREEMAN, A., LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, n.5, p.335-345, 1998.

FREITAS, F.F, Otimização do processo de imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em alginato de sódio com gelatina e glutaraldeído. Tese de doutorado em Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2007.

FREITAS, F.F, MARQUEZ, L.D.S.; RIBEIRO, G.P.; BRANDÃO, G.C. CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J.; A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, pp. 33-38, 2011.

FREITAS, M.F.M. Produção de β -galactosidase por *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564 em soro de leite e imobilização em quitosana. Dissertação de mestrado em engenharia química – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 621-634, jun. 1997.

GÄNZLE M.G., HAASE G., GELLEN P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value added derivatives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 685-694, 2008.

GARBAYO, I.; VILCHEZ, J. E.; BARBOTIN, J. N; NAVA-SAUCEDO. Nitrogen, carbon and light- mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 5, p. 629- 634, 2003.

GAUER,R.;PANT,H.;JAIN,R.;KHARE,S.K. Galacto – oligosaccharide by immobilized *Aspergillus oryzae* β – galactosidase. **Food Chemistry**, v.97, p.426 – 430, 2006.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114,p. 1-14. 2006.

GEKAS,V.; LOPEZ – LEIVA,M.L. Hydrolysis of lactose: a literature review.**Process Biochem**, v.20, n.2, p.2 – 12, 1985.

GENARI, A.N.; PASSOS, F.V.; PASSOS, F.M.L. Configuration of a bioreactor for milk lactose hydrolysis.**J Dairy Sci**, v.86, p.2783-2789, 2003.

GOULD, B.J. Enzyme Data. In: **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Wiseman A., 1972, Ed. Ellis Horwood Publisher.

GUIDINI, C.Z.; Imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. 199 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes and cells. **Humana Press Inc**, p. 450, 2006.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS,M.; SIPOCZ,M.; SEDLACKOVA, B. Entrapment of β - galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. **Biotechnol Lett**, v.30, p. 763-767, 2008.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β – galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **Biological Macromolecules**, v. 41, p. 72-80, 2007.

HAIDER, T.; HUSAIN,Q. Immobilization of β – galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate – starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey / milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p.172 – 177, 2009.

HAIR, P. R., CHANDY, T., SHARAMA, C. P., **Chitosan/calcium alginate beads for oral delivery of insulin**, Journal of Applied Polymer Science, v. 59, p. 1795–1801, 1996.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization.**Chem Soc Rev.**; v. 28, p.453-468, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HERNAIZ, M.J.; CROUT, D.H.G. Immobilization /stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme Microb. Technol**, v.27, p.26-32, 2000.

HERTZLER, S.; SAVAIANO, D. A.; JACKSON, K. A.; BHRIAIN, S.NI.; SUAREZ, F L. Nutrient Considerations in Lactose Intolerance. **Nutrient Considerations in Lactose Intolerance**. Chapter 40, 2013.

HUSAIN, Q. β – galactosidase and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**.v.30, n.1, p.41 – 62, 2010.

JACKSON, K.A.; SAVAIANO, D.A. Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in African, Asian, and Hispanic Americans. **J Am Coll Nutr.**, v.20, n.2, p.198-207, 2001.

JAFARY, F.; PANJEHPOUR, M.; VARSHOSAZ, J.; YAGHMAEI, P. Stability improvement of immobilized alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 02, p. 243-250, 2016.

JOCHEMS, P.; SATYAWALI, Y.; ROY, S.V.; DOYEN, W.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Characterization and optimization of β -galactosidase immobilization process on a mixed-matrix membrane. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p. 580-588, 2011.

KADOKAWA J.; SAITOU S.; SHODA S. Preparation of alginate- polymethacrylate hybrid material by radical polymerization of cationic methacrylate monomer in the presence of sodium alginate, **Carbohydrate Polymers**, v. 60, 253–258, 2005.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M.- Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.157–176, 2000.

KAWAGUTI, H.Y. Conversão enzimática da sacarose em isomaltulose. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

KENNEDY, S.F.; CABRAL, J.M.S. Enzyme Immobilization.**Enzyme Technology**, p. 761, 1987.

KISHORE, D.; KAYASTHA, A. M. Optimisation of immobilization conditions for chick pea β -galactosidase (cpgal) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis.**Food Chemistry**, v. 134, p. 1650-1657, 2012.

KHAN, A.A.; AKHTAR, S.; HUSAIN, Q. Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*), **Process biochem**, v. 40, p. 2379, 2005.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginatebiocatalysts.**Applied Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 86-91, 1983.

KLEIN, MANUELA POLETTO. **Imobilização de β – galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. 2010. 92p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre, 2010.

KLIBANOV, A.M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v.93, n.0, p.1-25, 1979.

KOBAYASHI, T.; KASUGA, S. (1976). Japanese Patent, 76,150,385.

KOKUFUTA, E.S.N.; TANAKA, H.; NAKARNURA, I. Use of polyelectrolyte complex-stabilized calcium alginate gel for entrapment of amylase. **Biotechnol Bioeng**, v. 32, p. 756-759, 1988.

KOUTINAS, A.A.; PAPAPOSTOULOU, H.; DIMITRELLOU, D.; KOPSAHELIS, N.; KATECHAKI, E.; BEKATOROU, A.; BOSNEA, L.A. Whey valorization: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. **Bioresour Technol**, v.100, p. 3734-3739, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin – and chitosan – based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, p. 126 – 139, 2004.

KULSHRESTHA, Y.; HUSAIN, Q. Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. **Biomolecular Engineering**, v.23, p.291-297, 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 583-592, 2000.

LEHNINGER, A.L. **Principles of Biochemistry**. 5a.ed. Macmillan, 2008.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. V. 3. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

LIMA, F.R.; ROCHA, L.O.F. Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: viabilidade econômica. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 83-93, 2016.

LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurte. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic – inorganic system. **Microporous and Mesoporous Mater**, v.118, p. 334 – 340, 2009.

MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alim.Nut.Araraq.**, v. 16, 2005.

MAHONEY, R.R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, Water, Salts and Vitamins. London, **Advanced Dairy Chemistry**, v.3,p. 77 – 125, 1997.

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S.J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technol. Biotechnol**, 2008.

MARTARELLO, R. D. Purificação de uma beta-galactosidase produzida por *Aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas. Brasília: Universidade de Brasília, Mestrado, 2016.

MARTINS, A.R.; BURKERT, C.A.V. Galacto - oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, p. 230 – 240, 2009.

MATEO, C; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIZA, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzymes and Microbial Technology**, v.40, n.6, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R. L. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, vol. 34, n. 5, p. 831 – 840, 2011.

MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. **Cerevisiae and Biotechnology**, v. 17, p. 55-56, 1992.

MILETIC, N.; VUKOVI, Z.; NASTASOVI, A.; LOOS, K. Macroporous poly (glycidyl methacrylate – co – ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196 – 201, 2009.

MILOSAVIC, N.; PRADONOVIC, R.; JOVANOVIĆ, S.; NOVAKOVIC, I.; VUJCIC, Z. Preparation and characterization of two types of covalently immobilized amyloglucosidase. **Journal Serb Chem Soc**, v.70, p.713-719, 2005.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase applications in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n.2, p.47-54, 2006.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p.9-23, 2009.

MORSCHBACHER, A.P.; VOLPATOLL, G.; SOUZA, C.F.V. *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.46, n.5, p. 921-926, 2016.

MORTOZA, A.R. Produção e purificação de beta-galactosidase expressa por fungo isolado do bioma cerrado brasileiro visando à aplicação como suplemento digestivo. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, 2012.

MUGURUMA, H.; KASE, Y.; MURATA, N.; MATSUMURA, K. et al. Adsorption of glucose oxidase onto plasma-polymerized film characterized by atomic force microscopy, quartz crystal microbalance, and electrochemical measurement. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 26033-26039, 2006.

MÜLLER, J.M.; SANTOS, R.L.; BRIGIDO, R.V. Produção de alginato por micro-organismos. **Polímeros**, vol.21, n. 4, p.305-310, 2011.

MUNIZ, L.C.; MADRUGA, S.W.; ARAÚJO, C.L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciênc Saúde Coletiva**.v.18, p.12 2013.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Gelatin blends with alginate: Gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, v.41, n.8, p. 1903- 1907, 2006.

NATH, A.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, S. BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Production, purification, characterization, immobilization, and purification of β -galactosidase: a review. **Asia Pac J Chem Eng**, v.9, p. 330-348, 2014.

NERI, D. F. M.; BALCÃO, V. M.; COSTA, R. S.; ROCHA, I. C. A. P.; FERREIRA, E. M. F. C.; TORRES, D. P. M.; RODRIGUES, L. R. M.; CARVALHO, Jr., L. B.; TEIXEIRA, J. A. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v.115, p.92-99, 2009.

NIE, C.; LIU, B.; ZHANG, Y.; ZHAO, G.; FAN, X.; NING, X. Production and secretion of *Lactobacillus crispatus* beta-galactosidase in *Pichia pastoris*.**Protein Expr Purif**, v.92, p. 88-93, 2013.

NISHA, S.; KARTHICK, A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, p. 148, 2012.

NIVETHA, A.; MOHANASRINIVASAN, V. Mini review on role of β -galactosidase in lactose intolerance. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 263, 2017.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} - independent

transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

NUMANOGLU, Y.;SUNGUR, S. β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. **Proc Biochem**, v. 39, p. 703–709, 2004.

OLIVEIRA, E.A. Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.*e aplicação na produção de frutooligossacarídeos. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ÖZDURAL, A.R.; TANYOLAÇ, D.; BOYACI, I.H.; MUTLU, M.; WEBB, C. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p. 27-36, 2003.

PAIGE, D.M. Lactose Intolerance. Encyclopedia of Human Nutrition.3 ed. p. 67– 73, 2013.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential applications of immobilized β - galactosidase in food processing industries.**Enzyme Research**, v.2010, 16 p., 2010.

PEREIRA, E.B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. 2004. f 171. Dissertação demestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC , 2004.

POLIZZI, K. M.; BOMMARIUS, A.S.; BROERING, J.M.; CHAPARRO – RIGGERS, J.F. Stability of biocatalysts.**Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 220 – 225, 2007.

REHM, B.H.A. Alginates: Biology and Applications. Microbiology Monographs, v. 13. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

ROBAYO-TORRES, C. C.; NICHOLS, B. L. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult- type hypolactasia. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 95-98, 2007.

RODRIGUES, R.C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A. TORRES, R.; FERNANEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6290-6307, 2013.

ROVEDA, M.;HEMKEMEIER,M.;COLLA,L.M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de micro-organismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 30, p.126-131, jan/mar. 2010.

ROY,I.; GUPTA, M.N. Lactose hydrolysis by LactozymTM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, v.39, p. 325-332, 2003.

SABRA, W.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 315–325, 2001.

SAQIB, S.; AKRAM, A.; HALIM, S.A, TASSADUQ, R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. **Biotech**, v.1, p.79, 2017.

SANTIAGO, P.A.; MARQUES, L.B.S; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de β – galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus* – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2004.

SANTOS, R.S.B. Estudo dos fatores que influenciam os atributos de esferas de alginatos. Dissertação de mestrado – Universidade de Aveiro – Departamento de Química – Aveiro, Portugal, 2012.

SAVAIANO, D.A.; RITTER, A.J.; KLAENNHAMMER, T.R.; JAMES, GARETH, M.; LONGCORE, A.T.CHANDLER, J.R.; WALKER, A.; FOYT, H. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial. **Nutr J.**, v.12, p.160, 2013.

SCHLIEKER, M.;VORLOP, K.D. A novel immobilization method for entrapment Lentikats, in **Immobilization of Enzymes and Cells**, 2nd edn, ed. by Guisan JM.Humana Press, Totowa, NJ, p 333–343, 2006.

SCHOFFER, J.N. Imobilização de ciclodextrina glicosiltransferase para produção de ciclodextrinas: catálise em batelada e catálise contínua em reator de leito fixo. Dissertação de mestrado – Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

SCHONS, P. F. Imobilização de tanase de *Paecilomyces variotti* e ação em reações de hidrólise e síntese. Tese de doutorado – Ciência de Alimentos – Unicamp, Campinas, 2012.

SCOUTEN, W.H.; JOHN, H.T.; LUONG, R.; STEPHEN, B. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trend in Biotechnology**, v.13, p.178-185, 1995.

SECUNDO, F.; MIEHE – BRENDLE, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Mater**, v. 109, p. 350 – 361, 2008.

SEN, S.; RAY, L.; CHATTOPADHYAY, P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus alliaceus*, **Appl. Biochem.Biotech**.V.167, pp.1938–1953, 2012.

SENER, N.; APAR, K.D.; ÖZBEK, B. A modeling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**.v.41, p.1493-1500. 2006.

SERIO, M. Di.; MATURO, C.; ALTERIIS, E.De.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, L. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, v. 79-80, p. 333-339, 2003.

SHELDON, R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.349, n.8-9, p.1289-1307, 2007.

SOARES, I.; TAVORA, Z.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Microorganism-produced enzymes in the food industry. **Agric. Bio.Sci**, v.488, pp 83-94, 2001.

SOUZA, W. C. J. Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Bioquímica Agrícola – Viçosa, 2006.

SPALATELU, C. Biotechnological valorization of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.10, 1-8, 2012.

STERNENZYM GmbH & Co. KG. <http://sternenzym.de/downloads/sternenzym-dairyzym-en.pdf>.

STORKER, T.M.; SKJA, K.; BRYK, G.; SMIDSRD, O. Covalently crosslinked sodium alginate beads. **Food Hydrocolloids**, v.5, p.119-123, 1991.

SWALLOW, D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annu Rev Genet**, v.37, p.197–219, 2003.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β – galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 10, p. 631 – 637, 2000.

SYNOWIECKI, J.; WOLOSOWSKA, S. Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1417-1422, 2006.

TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. **Biomaterials**, v.24, p.1937-1945, 2004.

TEIXEIRA, V. F. T. Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ, 2011, 88 p.

TÉO, C.R.P.A. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **ArqCiência Saúde UNIPAR**, v.6, n.3, p.135-140, 2002.

TOMAL, A. A. B., CUNHA, M. E. T., BOSSO, A., YOUSSEF, E. Y. e SUGUIMOTO, H. H. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **UNOPAR, Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

TROELSEN, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 172, p. 19– 32, 2005.

VAIDYA, B.K.; INGAVLE, G.C.; PONRATHNAM, S.; KULKARNI, B.D.; NENE, S.N. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (allyl glycidyl ether – co – ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. **Bioresource Technology**, v.99, p 3623 – 3629, 2008.

VIEIRA, D. C. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação . Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Carlos-UFSCar - São Carlos : 2009.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis**, v.9, p. 113-148. 2000.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v. 4, cap. 14, p. 387-420, 2001.

VORLOP, K.D.; JEKKEL, M. Process for preparing a polyvinyl alcohol gel and mechanically highly stable gel produced by this process. **WO Patent** 9967320, 1999.

ZADOW, J. G. Lactose: Properties and uses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2654-2679, 1984.

ZHOU, H.X.; DILL, K.A. Stabilization of proteins in confined spaces. **Biochemistry**, v.40, p.11289-11293, 2001.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by gluteraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.

WALLENFELS, K.; LEHMANN, J.; MALHOTRA, O.P. Research on lactose-splitting enzymes. The specificity of beta-galactosidase from *E. coli* ML 309. *Biochem Z*, v.333, p.209-225, 1960.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2a ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

WANG, L. et al., Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering, **Biomaterials**, v. 24, 3475–3481, 2003.

WIDMER, F. LEUBA, J. L. β -galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms. **Eur. J Biochem**, v.100, p. 559-567, 1979.

WORTMANN, A. C.; SIMON, D.; DA SILVEIRA, T. R. Análise molecular da hipolactasia primária do tipo adulto: uma nova visão do diagnóstico de um problema antigo e frequente. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 57, n. 4, p. 335-343, out./dez. 2013.

WU, J.M.; CHEN, Z.X.; RAN, D.L. Cross-linking chitosan immobilized on sílica gel as a matrix for preparation of affinity chromatographic material. **Clin J Analyt Chen**, v. 30, pp. 1063 – 1067, 2002.

YOO, I.K.; SEONG, G.H.; CHANG, H.N.; PARK, J.K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.19, n.5, p.428-433, 1996.

8 ANEXO – CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A768FF8

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A768FF8
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Estudo da imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces marxianus var lactis* em matriz de alginato de cálcio, gelatina e transglutaminase**

Equipe

Ana Paula Spezia Darif	UNICAMP
Hélia Harumi Sato	UNICAMP

Data do Cadastro:	25/09/2018 20:34:37
Situação do Cadastro:	Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 20:36 de 25/09/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**